

A PROCESS FOR THE PREPARATION OF LIPASE

Publication number: JP7504561T

Publication date: 1995-05-25

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: **C12N15/09; C07K14/21; C12N1/21; C12N9/20; C12N15/00; C12N15/55; C12P19/38; C12R1/07; C12R1/19; C12R1/38; C12N15/09; C07K14/195; C12N; C12N1/21; C12N9/18; C12N15/00; C12N15/55; C12P19/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/21; C12N9/20; C12P19/38; C12N15/09; C12R1/07; C12N1/21; C12R1/19; C12N9/20; C12R1/38**

- European: **C07K14/21; C12N9/20**

Application number: JP19920510426D 19921218

Priority number(s): WO1992DK00391 19921218; WO1991DK00402 19911220

Also published as:



WO9313200 (A)

EP0681609 (A1)

US5681715 (A1)

FI942907 (A)

EP0681609 (A0)

[Report a data error](#) [he](#)

Abstract not available for JP7504561T

Abstract of corresponding document: **WO9313200**

A process for producing an active lipase enzyme in vitro, comprising mixing an inactive or partly active lipase enzyme with a chaperone molecule and subjecting the mixture to denaturation followed by renaturation to produce the active lipase enzyme.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-504561

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)5月25日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 N 15/09	ZNA		
1/21		8828-4B	
9/20		8827-4B	
		9281-4B	
		C 12 N 15/00	ZNA A
		(C 12 N 15/00)	ZNA A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 24 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平5-510426
(86) (22)出願日 平成4年(1992)12月18日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)6月20日
(86)国際出願番号 PCT/DK92/00391
(87)国際公開番号 WO93/13200
(87)国際公開日 平成5年(1993)7月8日
(31)優先権主張番号 PCT/DK91/00402
(32)優先日 1991年12月20日
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), B R, C A, F I, J P, K R, U S

(71)出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカブ
デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ
エルト, ノボ アレ (番地なし)
(72)発明者 ヨルゲンセン, ステーン トレイルス
デンマーク国, デーコー-3450 アレレー
ズ, ブルヌスバイ 5
(72)発明者 ディデリフセン, ポエルゲ クラグ
デンマーク国, デーコー-3460 ビルケレ
ーズ, フグレサンスバイ 4
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 リバーゼの製造のための方法

(57)【要約】

インピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法
であって、不活性又は部分的に活性なリバーゼ酵素をシ
ヤベロン分子と混ぜ合わせ、次いでこの混合物を変性、
それに統いて再生に付して活性リバーゼ酵素を生成せし
めることを含んで成る方法。

特許平7-504561 (2)

請求の範囲

1. インビトロで活性リバーゼを製造するための方法であつて

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリバーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリバーゼ酵素を変性に付する、

(b) 工程(a)で得られたこの変性したリバーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程(b)の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

2. インビトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法であつて、

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでそのリバーゼ酵素をこの培養物から回収する、

(b) この回収されたリバーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程(b)の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

3. 前記シャペロン分子が、このシャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、このシャペロン分子が生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでこの培養物からそ

9. 前記のリバーゼ酵素をエンコードするDNA配列に、パチルスステアロサーモフィルス マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、パチルス リシニホルミス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリリンプロテアーゼ遺伝子もしくはパチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP₁もしくはP₁プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項8に記載の方法。

10. 前記リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列に、パチルスステアロサーモフィルス マルトジェニック遺伝子、パチルス リシニホルミス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリリンプロテアーゼ遺伝子もしくはパチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP₁もしくはP₁プロモーター、ファージT7遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項8に記載の方法。

11. 前記リバーゼ酵素が細胞内で高収率で生産される、請求項1-10のいづれか1項に記載の方法。

12. 前記リバーゼ酵素が対人体の形態で生産される、請求項11に記載の方法。

13. 前記シャペロン分子がショードモナス リバーゼ調節因子又はその誘導体である、請求項1-5のいづれか1項に記載の方法。

14. 前記シャペロン分子が、ショードモナス キバシア リバーゼ調節因子、ショードモナス グルメ リバーゼ調節因子、ショードモナス アエルギノーザ リバーゼ調節因子又はそれらの誘導体より成る群から選ばれる、請求項13に記載の方法。

15. 前記シャペロン分子の生産のための宿主細胞が大腸菌である、請求項3に記載の方法。

のシャペロン分子を回収することによって生成されたものである、請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記シャペロン分子が、工程(b)において変性リバーゼに加えられる前に変性処理に付されている、請求項1-3のいづれか1項に記載の方法。

5. インビトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法であつて

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるのに適する条件のもとで培養し、次いでリバーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から回収する、

(b) 任意的にこの混合物への更なる量のシャペロン分子の添加を伴って、工程(a)の混合物を変性、それに続く再生に付し、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

6. 前記リバーゼ酵素がショードモナス 又はクロモバクター種に由来するものである、請求項1-5のいづれか1項に記載の方法。

7. 前記リバーゼ酵素が、ショードモナス キバシア、ショードモナス フラギ、ショードモナス グラジオリ、ショードモナス フルオレセンス、ショードモナス スタッフエリ、ショードモナス フルカリゲンス、ショードモナス シュードアルカリゲンス、ショードモナス ブチダ、ショードモナス グルメ、ショードモナス アエルギノーザもしくはクロモバクター ピスコスムのリバーゼ、又は前記のリバーゼ酵素の誘導体である、請求項6に記載の方法。

8. リバーゼ酵素の生産のために前記の宿主細胞が大腸菌である、請求項1-7のいづれか1項に記載の方法。

16. 前記のシャペロン分子をエンコードするDNA配列に、パチルスステアロサーモフィルス マルトジェニックアミラーゼ遺伝子、パチルス リシニホルミス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリリンプロテアーゼ遺伝子もしくはパチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージラムダP₁もしくはP₁プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項15に記載の方法。

17. 前記シャペロン分子をエンコードするDNA配列に、パチルスステアロサーモフィルス マルトジェニック遺伝子、パチルス リシニホルミス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス アミロリケファシエンス ターアミラーゼ遺伝子、パチルス スブチリス アルカリリンプロテアーゼ遺伝子、パチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子、ファージT7遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項15に記載の方法。

18. 前記シャペロン分子が細胞内で高収率で生産される、請求項13-17のいづれか1項に記載の方法。

19. 前記リバーゼ酵素がショードモナス キバシア リバーゼであり、そして一方、前記シャペロン分子がショードモナス キバシア リバーゼ調節因子である、請求項1-18のいづれか1項に記載の方法。

20. DNA構造体であつて、シャペロン分子をエンコードする第二DNA配列にリバーゼ酵素をエンコードする第一DNA配列が、そのリバーゼ酵素及びシャペロン分子又はその機能的な一部がこのDNA構造体で形質転換された適当な宿主細胞を培養することで单一の融合タンパク質として発現されるように融合してその第一DNA配列を含

特許平7-504561 (3)

んで成るDNA構築体。

21. 前記リバーゼ酵素をエンコードする第一DNA配列がショードモナス又はクロモバクター種に由来するものである、請求項20に記載のDNA構築体。

22. 前記第一DNA配列が、ショードモナス セバシア、ショードモナス フラギ、ショードモナス グラジオリ、ショードモナス フルオレセンス、ショードモナス スタッフェリ、ショードモナス アルカリゲンス、ショードモナス ショードアルカリゲンス、ショードモナス ブチダ、ショードモナス グルメ、ショードモナス アエルギノザもしくはクロモバクター ビスコスムのリバーゼ、又は前記のリバーゼ酵素の誘導体をコードするものである、請求項21に記載のDNA構築体。

23. 前記第二DNA配列が、ショードモナス リバーゼ調節因子又はその誘導体をエンコードするものである、請求項20に記載のDNA構築体。

24. 前記第二DNA配列が、ショードモナス セバシア リバーゼ調節因子、ショードモナス グルメ リバーゼ調節因子、ショードモナス アエルギノザ 調節因子又はそれらの誘導体をエンコードするものである、請求項23に記載のDNA構築体。

25. 前記第一DNA配列が、ショードモナス セバシア リバーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして他方、前記第二DNA配列がショードモナス セバシア リバーゼ調節因子又はその誘導体をエンコードする、請求項20-24のいづれか1項に記載のDNA構築体。

26. 本明細書に添付のSEQ ID NO.7に示す配列を有する請求項25に記載のDNA構築体。

27. 請求項20-26のいづれか1項に記載のDNA構築体を含んで成る組換え発現ベクター。

28. 請求項20-26のいづれか1項に記載のDNA構築体又は請求項27に記載の組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

29. 大腸菌の株の細胞である、請求項28に記載の宿主細胞。

30. 前記のDNA構築体に、バチルス スチアロサーキフィルス マルトジュニックアミラーゼ遺伝子、バチルス リシュニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリソブチリスアーゼ遺伝子もしくはバチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子のアロモーターが、又はファージラムダP₁もしくはP₂プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターが先行している、請求項29に記載の宿主細胞。

31. 前記DNA構築体に、バチルス スチアロサーキフィルス マルトジュニック遺伝子、バチルス リシュニホルミス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス α-アミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリソブチリスアーゼ遺伝子、バチルス ブミルス キシロシダーゼ遺伝子、ファージT7遺伝子又は大腸菌lac遺伝子のリボソーム結合部位が先行している、請求項29に記載の宿主細胞。

32. 活性状態におけるリバーゼを製造するための方法であって、リバーゼを生産するのに適する条件のもとで請求項28-31のいづれか1項に記載の宿主細胞を培養し、そしてこの培養物からリバーゼを回収することを含んで成る方法。

33. リバーゼ酵素を変性及び再生する方法であって、
(a) リバーゼ酵素を変性処理に付する、
(b) 工程 (a) において得られた変性リバーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャベロン分子と混ぜ合わせる、そして
(c) 工程 (b) の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を

生成すること、

を含んで成る方法。

34. リバーゼ酵素の変性及び再生処理のための方法であって、

a) 変性及び再生処理に付すべきリバーゼ酵素をシャベロン分子と混ぜ合わせる、そして

b) 工程 a) の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る方法。

明細書

リバーゼの製造のための方法

発明の分野

本発明は、インビトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法、リバーゼをエンコードするDNA構築体、このDNA構築体を含む組換えベクター、及びこのベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

発明の背景

リバーゼは、トリグリセリドの中のエステル結合の加水分解を触媒して、ジグリセリド、モノグリセリド、グリセリン及び遊離脂肪酸の形成をもたらしめる酵素である。一部のリバーゼはエステル結合にかかわっているその他の反応、例えばエステル結合の合成又はエステル交換反応も触媒する。リバーゼは幅広く様々な生物により生産される。特に微生物リバーゼは、食品産業及び洗剤の如きの脂肪のリボ分解が所望されている様々な目的にとって実用的にかなり有用である。

布帛からの脂肪のしみ又は汚れの除去のための洗剤の中に含まれるのに特に好都合であるといい出されているある特定のリバーゼは、ショードモナス セバシア (Pseudomonas cepacia)の株により生産されるリバーゼである。EP214751号において (Novo Industri A/S)、このリバーゼは60°C以下の温度で活性であるリバーゼとして開示されており、これは重要であり、なぜなら最近は布帛は60°C以下の温度で洗浄されているからである。

洗剤添加剤として利用するに別の重要なショードモナス セバシア リバーゼは、W089/01032 (Novo Industri A/S)において部位

非特異性リバーゼとして開示されているもの、即ち、トリグリセリドの3個の脂肪アシル基全てと反応できるものである。

ショードモナス カバシア リバーゼ生産を助長するために、組換DNA技術を、例えば酵素をエンコードするDNA配列を発現せしめる強力なプロモーターを導入することにより、又はより効率的なリバーゼ発現を最適化するために、あるいは酵素の生産のための、培養し易い(例えば標準の生産性生物、例えば大腸菌を選ぶこと)又は高めのリバーゼ収率をもたらしめる宿主生物を選ぶために、採用することが好都合であります。

しかしながら、以下に説明する通り、かかる手法は時折り予測の結果を得ることに失敗することが、例えば菌のタンパク質をコードする構造遺伝子の他に1又は複数の遺伝子がその遺伝子生成物の生産にある程度の役割を担っているときのケースにおいてあります(かかる遺伝子の例は、バチルス (Bacillus) 的 sac 及び lep 遺伝子、並びにクレブシーラ (Klebsiella) プルラーネ及び大腸菌ヘモリシンの生産にとって必要な遺伝子である)。

別のショードモナスの種、ショードモナス フラギ (Pseudomonas fragi)からのリバーゼ遺伝子のクローニングは、例えばS. Aoyamaら (1988) 及びH. Sugiyamaら (1988) より公知となっています。しかしながら、P. フラギより生産されるリバーゼは、P. カバシアより生産されるそれとはそのアミノ酸配列において相違しており、そしてこれらの文献において、宿主生物の中で有意味な量のリバーゼの生産を達成するのに1又は複数の異なる遺伝子が必要でありますことの示唆はない。

EP331376号は、ショードモナス カバシア リバーゼをエンコードする組換DNA及びこのリバーゼの生産にかかわるタンパク質を開

示する。

WO90/00908号は、宿主細胞の中で発現されるポリペプチドによる異種宿主細胞におけるショードモナス カバシア リバーゼの生産を開示しており、そのポリペプチドはリバーゼ生産の調節因子として働いている。

発明の概要

驚くべきことに、組換宿主細胞により生産される活性リバーゼ酵素の収率は、その細胞から回収されたリバーゼを変性、それに続くシャペロン (chaperone) 分子の存在下での再生に付したときに高めることが可能であることが見い出された。

従って、本発明はインピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法に開示し、この方法は

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリバーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリバーゼ酵素を変性に付する。

(b) この変性したリバーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程 (b) の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

他方、本発明はインピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法に開示し、この方法は

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で

生産されるに適する条件のもとで培養し、次いでそのリバーゼ酵素をこの培養物から回収する。

(b) この回収されたリバーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程 (b) の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

更なる観点において、本発明はインピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法に開示し、この方法は

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列及びシャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で生産されるに適する条件のもとで培養し、次いでリバーゼ酵素シャペロン分子混合物をこの培養物から回収する。

(b) 任意的にこの混合物への更なる量のシャペロン分子の添加を伴って、工程 (a) の混合物を変性、それに続く再生に付し、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

上述した通り、本発明は、タンパク質又はタンパク質複合体の天然のコンホーメーションが常にそのタンパク質のアミノ酸配列によってのみ決定されるわけではないことの発見に基づいています。従って、あるケースにおいては、シャペロン分子と呼ばれているアクセサリータンパク質が別のタンパク質又はタンパク質複合体の適正なる三次構造の形成を仲介するのに必要であるが、それら自体は最終構造複合体の成分ではない (Ellisら, 1991)。

本明細書において、「シャペロン分子」なる語は、かかるアクセサリータンパク質、即ち、他のポリペプチドのそのほどかれた状態

の保持を助長することに、その適正なトランスマシンブラン標的化又は折りたたみ及びオリゴマー構成を可能とすることに、並びにタンパク質複合体の解離にかかるタンパク質を意味することを意図している (R. J. Ellis と S. H. Hemmingsen (1989), J. E. Rothman (1989), Morimotoら (1990) を参照のこと)。一般に、標的タンパク質又はタンパク質複合体の共有修飾はシャペロン分子の作用によっては観察されていないが、本発明の方法において用いるシャペロン分子がかかる共有修飾を及ぼしめることが可能であることを排除することはできない。従って、本明細書で用いている「シャペロン分子」なる語は、リバーゼ酵素の非共有及び共有修飾を及ぼしめるシャペロン分子を包括することを意図している。

別の観点において、本発明は、リバーゼ酵素をエンコードする第一DNA配列を含んで成るDNA構築体に開示し、この第一DNA配列は、シャペロン分子をエンコードする第二DNA配列に、このリバーゼ酵素及びシャペロン分子又はそれらの標的性部分が、そのDNA構築体で形質転換された適当な宿主細胞の培養に基づき、单一の融合タンパク質として発現されるような状況で融合されている。

発明の詳細な開示

前述の工程 (a) における回収及び任意的に変性されたリバーゼ酵素に添加すべきシャペロン分子は、シャペロン分子をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞をそのシャペロン分子を生成するに適する条件のもとで培養し、次いでそのシャペロン分子をその培養物から回収することを含んで成る方法によって生成されることが好都合である。更に、変性リバーゼ酵素にシャペロン分子を添加するとき、そのシャペロン分子自体が変性していることが好都合であります。従って、本発明の方法は、シャペロン分子を工程 b)

における変性リバーゼ酵素と混ぜ合わせる前に、それを変性処理に付する更なる工程を含んで成りうる。

本明細書において、リバーゼ酵素について用いている「部分的に活性な状態」とは、リバーゼが、例えば後述するpHスケートを利用して活性検定による活性測定による決定に従い、完全ではないがある程度の活性を有することを意味していることを意図している。完全より劣る活性とは、その部分的に活性なりバーゼ調製品が、完全活性リバーゼタンパク質の対応の調製品に比して低い比較性を有する意味としてとられる（この二つの調製品は、純度が同じリバーゼタンパク質を含む）。

不活性又は部分的に活性なりバーゼ酵素及び任意的なシャペロン分子の変性（これは、本発明の方法に従い、別々に、又はこの2種の成分の混合物に基づいて実施されうる）は公知の方法で実施されうる。例えば、その変性は、その混合物を変性剤（例えばB.M.の尿素）の作用に付し、次いでその変性剤を例えば透析により除去することによって獲得されうる。

本発明の方法による調製にとって好適なリバーゼは、ショードモナス種又はクロモバクター (*Chromobacter*) 種に由来する。特に、このリバーゼ酵素は、ショードモナス セバシア、ショードモナス フラギ、ショードモナス グラジオリ (*Pseudomonas gladioli*)、ショードモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、ショードモナス スタッツエリ (*Pseudomonas stutzeri*)、ショードモナス アルカリゲンス (*Pseudomonas alkaligenes*)、ショードモナス シュードアルカリゲンス (*Pseudomonas pseudalkaligenes*)、ショードモナス アチダ (*Pseudomonas putida*)、ショードモナス グルメ (*Pseudomonas glucon*)（例えばEP407225に記載）、ショードモナス アエルギノゾ (*Pseudomonas aeruginosa*)、もしくはク

ロモバクター ピスコスム (*Chromobacter viscosus*) リバーゼ、又は前記リバーゼ酵素の供与体でありうる。特に、リバーゼ酵素はショードモナス セバシアの株、例えばEP214761号に記載の発明に關係してドイツ サムルンク フォン ミクロオルカニズメンに寄託されている寄託番号DSM 3333-3337 及びDSM 3401の株、並びに、W089/01302に開示されている発明に關係してドイツ サムルンク フォン ミクロオルカニズメンに寄託されている寄託番号DSM 3958の株に由来するものである。

本明細書において、「調導体」なる語は、天然のリバーゼから、その天然リバーゼをコードするDNA配列を適宜改変せしめ、その天然タンパク質のC-及びN-末端のいづれか又は両者に1又は複数のアミノ酸を付加を得ること、天然アミノ酸配列における1又は複数の異なる部位において1又は複数のアミノ酸の置換を得ること、天然タンパク質の末端のいづれかもしくは両者において、又はそのアミノ酸配列の中の1又は複数の部位において欠失を得ること、あるいは天然アミノ酸配列における1又は複数の部位において1又は複数の挿入を得ること、により誘導された、リボ分解活性を有するタンパク質を意味することを意図する。天然タンパク質についてコードするDNAのかかる修飾はよく知られており、そして当業界において幅広く実施されている。典型的には、この調導体のアミノ酸配列は、天然リバーゼタンパク質のそれと相間性である、即ち、例えばかなりの度合いの相間性を示すか、又はその調導体は、その天然リバーゼに対して発生せしめた抗体と反応するであろう。

本発明の方法において用いられる宿主細胞はあらゆる適当な細胞であって、培養により大量のリバーゼを生産するものでありうる。適当な細胞の例にはグラム陽性細菌、例えばバチルス スブテリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス リシュニホルミス (*Bacillus*

licheniformis)、バチルス レンヌス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス ステアロサーキフィルス (*Bacillus Stearothermophilus*)、バチルス アルカロフィルス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス コアギュラシス (*Bacillus coagulans*)、バチルス サーキュラシス (*Bacillus circulans*)、バチルス ラウタス (*Bacillus latus*)又はスレートマイセス リビダンス (*Streptomyces lividans*)でありうる。大腸菌は高収率の、即ち純細胞タンパク質の少なくとも5%（細胞内）リバーゼを生産することができ、従って好適な宿主生物である。大腸菌において、リバーゼ酵素は封入体（inclusion bodies）の状態で生産されるのが典型的である。細菌の形質転換は例えばプロトプラストの形質転換により、又はコンピテント細胞の利用により、公知の方法で行われうる。その他の適当な細菌宿主細胞は、ショードモナス種の細胞、例えばショードモナス セバシア、ショードモナス フラギ、ショードモナス グラジオリ、ショードモナス フルオレセンス、ショードモナス スタッツエリ、ショードモナス アルカリゲンス、ショードモナス シュードアルカリゲンス、ショードモナス アチダ、ショードモナス グルメ又はショードモナス アエルギノゾの細胞である。

他方、宿主細胞は酵母、即ち酵母又は糸状菌類の細胞でありうる。この酵母宿主細胞は例えばサッカロマイシス (*Saccharomyces*)属の細胞、例えばS. cerevisiae (*S. cerevisiae*)でありうる。糸状菌類の宿主生物は好適には組換タンパク質を生産するのに従来から宿主として利用されてきたもの、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*)種の株、例えばA. niger (*A. niger*)、A. nidulans (*A. nidulans*) 又はA. oryzae (*A. oryzae*)でありうる。菌類の宿主細

胞を形質転換するのに及び組換タンパク質の発現を獲得するのに利用されている技術はEP238023号に記載されているものが適当でありうる。

宿主細胞中のタンパク質の発現にとって、このタンパク質をエンコードするDNA配列にプロモーターが先行していよい。このプロモーターは選ばれた宿主の中で強力な転写活性を示すあらゆるDNA配列であってよく、そして細胞外又は細胞内タンパク質、例えばアミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リバーゼ、セルラーゼ又は解糖酵素をエンコードする遺伝子に由来しうる。

タンパク質の発現にかかるその他の配列には、終止及びポリアデニル化配列、並びにリボソーム結合部位が含まれ、そしてプロモーターと同じ起源に由来するのが適当でありうる。

本発明の方法において、リバーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列には、バチルス ステアロサーキフィルス マルトジエニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシュニホルミス ローハミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス ローハミラーゼ遺伝子、バチルス スブテリス アルカリゲンス ロテアーゼ遺伝子、もしくはバチルス アミルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーターが、又はファージMダP、もしくはP₁プロモーター、ファージT7遺伝子10プロモーターもしくは大腸菌lacプロモーターが先行しているのが好都合である。リバーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列には、バチルス ステアロサーキフィルス マルトジエニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシュニホルミス ローハミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス ローハミラーゼ遺伝子、バチルス スブテリス アルカリゲンス ロテアーゼ遺伝子、バチルス アミルス キシロシダーゼ遺伝子、ファージT7遺伝子10又は大腸菌lac遺伝子の

リボソーム結合部位が先行していてよい。

本発明に従うと、シャペロン分子はショードモナス リバーゼ調節タンパク質、好ましくはショードモナス セバシア リバーゼ調節因子 (W090/00908号に開示)、ショードモナス グルメ リバーゼ調節因子及びショードモナス アエルギノーザ リバーゼ調節因子より成る事から選ばれるもの、又は任意のかかるリバーゼ調節因子の誘導体であることが好都合である。

本明細書において、リバーゼ調節因子の誘導体は、リバーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前記の通りに、天然リバーゼ調節因子についてコードするDNA配列を適宜改変することにより天然リバーゼから誘導されたシャペロン活性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャペロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リバーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定されうる。

本発明にかかる方法の好適な態様において、リバーゼ酵素はショードモナス セバシア、リバーゼ又はその誘導体であり、そしてシャペロン分子はショードモナス セバシア リバーゼ調節因子 (又はその誘導体) でありうる (共に、W090/00908号に開示)。

リバーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を含んで成る本発明のDNA構造体はゲノム又はcDNA起源であってよく、例えば適当な生物のゲノム又はcDNAライブラリーを用意し、そしてリバーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA配列を、標準の技術に従う (Sambrookら、1989を参照のこと) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA構造体は確立されている標準的な方法、例えばS. L. Beaucageら (1981)、Matthesら (1984) により述べられているホ

スホアミジット法により合成的に製造することもできる。ホスホアミジット法に従うと、オリゴスクレオチドを例えば自動DNA合成装置で合成し、精製、リゲートそして適宜のベクターの中にクローニングする。

最後に、このDNA構造体は合成とゲノムとの複合物、合成とcDNAとの複合物、又はゲノムとcDNAとの複合物であって、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント (適宜) を、この全DNA構造体の様々な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートすることによって製造したものでありうる。

本発明のDNA構造体において、リバーゼ構造体をエンコードするDNA配列はショードモナス類又はクロモバクター種に由来するものであってよい。例えば、前記第一DNA配列は、ショードモナス セバシア、ショードモナス ブラギ、ショードモナス グラジオリ、ショードモナス フルオレセンス、ショードモナス スタッフェリ、ショードモナス アルカリゲンス、ショードモナス シュードアルカリゲンス、ショードモナス アチダ、ショードモナス グルメ、ショードモナス アエルギノーザもしくはクロモバクター ピスコスムリバーゼ、又は上記のリバーゼ酵素の誘導体をエンコードするものでありうる。前記第二DNA配列は、ショードモナス セバシア リバーゼ調節因子、ショードモナス グルメ リバーゼ調節因子、ショードモナス アエルギノーザリバーゼ調節因子、もしくはその他のショードモナス リバーゼ調節因子タンパク質、又は任意のこれらの調節因子の誘導体をエンコードするものでありうる。最も好ましくは、この第一DNA配列はショードモナス セバシアリバーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA配列は引用することで本明細書に記載するW090/00908号に記載のショードモナス セバシアリバーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコード

ドする。

特に好適なDNA構造体は本明細書に添付したSBQ ID No.5に示す配列を有するものである。この配列は常用の方法に従って改変されていてよい。このDNA配列の適当な改変の例は、スクレオチド置換であって、リバーゼ又はリバーゼ調節因子のアミノ酸配列を別のものにはしないが、そのDNA構造体を導入する宿主生物のコドン用法に対応しうる置換、又はスクレオチド置換であって、リバーゼもしくはリバーゼ調節因子のいづれもの性質を損うことなく、別のアミノ酸配列による、それ故、可逆としては、別のポリペプチド構造にする置換である。その他の可能な改変の例は、配列への1又は複数のスクレオチドの挿入、配列のいづれかの末端での1又は複数のスクレオチドの付加、及び配列の末端又は配列内のいづれかでの1又は複数のスクレオチドの欠失である。

更なる観点において、本発明は前記のDNA構造体を含んで成る組換え発現ベクターに關連する。リバーゼ及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を保有する発現ベクターは、一定の宿主生物の中での自己複製可能な任意のベクター、典型的にはプラスミド又はバクテリオファージでありうる。ベクターにおいて、リバーゼ及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列は適当なプロモーター配列に作動連結しているべきである。このプロモーターは宿主細胞の中で転写活性を示す任意のDNA配列であってよく、そして宿主生物に対して同種又は異種のいづれものタンパク質をエンコードする遺伝子に由来しうる。このプロモーターは好ましくはバチルス ステアロサーモフィルス マルトジフェニック アミラーゼ遺伝子、バチルス リシェニホルミス ターアミラーゼ遺伝子、バチルス アミロリケファシエンス ターアミラーゼ遺伝子、バチルス スブチリス アルカリソーダ プロテアーゼ遺伝子もしくはバチルス

ブヨルス キシロシダーゼ遺伝子のプロモーター、又はファージラムダP₁もしくはP₂プロモーター、ファージ17遺伝子10プロモーター、又は大腸菌lacプロモーターである。

このベクターは選択マーカー、例えば選択子であってその生成物が抗生物質耐性、例えばアンビシリン、クロラムフェニコールもしくはチトラサイクリン耐性を授けるもの、又は且、スブチリスもしくは且、リシェニホルミス由来のlacZ遺伝子も含んで成りうる。

更なる別の観点において、本発明は活性状態におけるリバーゼの製造方法に關連し、この方法は、上記のDNA構造体で形質転換された宿主細胞をこのリバーゼを生産するのに適する条件のもとで培養し、次いでこの培養物からリバーゼを回収し、任意的にこのリバーゼ/シャペロン融合タンパク質の変性及び再生が後に続くことを含んで成る。

細胞の培養に用いられる培地は細菌の増殖にとって適当な任意の常用の培地でありうる。リバーゼはこの培地から、常用の手順、例えば、必要ならば細胞内生成物を回収するための細胞の破壊の後の遠心もしくは沈澱により、塩、例えば硫酸アンモニウムによる上清液もしくは液液のタンパク質性成分の沈殿、それに続く様々なクロマトグラフィー手順、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等による精製により、分離せしめることによって回収されうる。

活性リバーゼ酵素の調製におけるシャペロン分子の利用は組換えDNA技術に關連して特に重要であるが (前記に説明した通り)、シャペロン分子の存在は、リバーゼ酵素の製造方法にかかわらず、本明細書記載の活性リバーゼ酵素が所望する任意の変性及び再生処理に關連して重要である。従って、例えば変性処理に付すべき天然又は遺伝子操作にかけられていない生物の常用の発酵により生産され

るリバーゼ酵素に関して、その後の再生処理におけるシャベロン分子の存在は重要であると信じられている。

従って、異なる一般的な観点において、本発明はリバーゼ酵素を変性及び再生する方法に関するものである。

- a) リバーゼ酵素を変性処理に付する、
- b) 工程a)において得られた変性リバーゼ酵素を、任意的に変性処理に付しておいたシャベロン分子と混ぜ合わせる、そして
- c) 工程b)の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

従って、リバーゼ酵素の変性／再生処理は

- a) 変性及び再生処理に付するベクタリバーゼ酵素をシャベロン分子と混ぜ合わせる、そして
- b) 工程a)の混合物を変性、それに続く再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

により実施されうる。

図面の説明

本発明を、添付の図面を参考にしながら下記で説明する。ここで図1はプラスミドpAHE2を示し；

図2はプラスミドpAHE8を示し；

図3はプラスミドpAHE10を示し；

図4はプラスミドpCBE6を示し；

図5はプラスミドpCBE7を示し；

図6はプラスミドpCBE12を示し；

図7はプラスミドpCBE18を示し；

図8はプラスミドpCBE19を示し；

特表平7-504561 (7)

図9は例3に記載の通りに実施した大腸菌JA221において発現させたタンパク質のSDS-PAGE分析の結果を示し、ここでそれらのレーンは：

A & S	分子量マーカー	45, 36, 24及び20
B	pJW2 (ベクター)	
C	pSJ150 (pUC中のオリジナルのリバーゼ構造体)	
D	pAHE2	30°C 1.0 時間 (hr)
E	pAHE2	42°C 1.0 hrs
F	pAHE2	42°C 1.5 hrs
G	pAHE2	42°C 2.0 hrs
H, M & R	P. エバシア由来の精製リバーゼ	
I	pAHE10	30°C 1.0 hrs
J	pAHE10	42°C 1.0 hrs
K	pAHE10	42°C 1.5 hrs
L	pAHE2	42°C 2.0 hrs
N	pCBE6	-IPTG 1.0 hrs
O	pCBE6	+IPTG 1.0 hrs
P	pCBE6	+IPTG 1.5 hrs
Q	pCBE6	+IPTG 2.0 hrs

図10はLip 抗体を利用した例3記載の通りに実施したイムノプロット分析の結果を示し、ここでレーンは：

A	pJW2 (ベクター)		
B	pSJ150		
C	pAHE2	30°C	1.0 hr
D	pAHE2	42°C	1.0 hr
E	pAHE2	42°C	1.5 hrs
F	pAHE2	42°C	2.0 hrs
G, L, Q, S	P. エバシア由来の精製リバーゼ (10LD)		
H	pAHE10	30°C	1.0 hr
I	pAHE10	42°C	1.0 hr
J	pAHE10	42°C	1.5 hrs
K	pAHE10	42°C	2.0 hrs
M	pCBE6	-IPTG	1.0 hr
N	pCBE6	+IPTG	1.0 hr
O	pCBE6	+IPTG	1.5 hrs
P	pCBE6	+IPTG	2.0 hrs
R	pAHE2 + pAHE10	42°C	1.5 hrs

図11は、リバーゼのイムノプロット分析により決定されたP. エバシア中のLipAの細胞所在 (図11a)、並びにP. エバシアの細胞内 (細胞質及び細胞内膜)、ペリプラズマ及び細胞外百分においてオレインアルコールで誘発されたLip (図11b)を示す。等量のタンパク質を、0.01, 17及び21%のそれぞれに対応する各レーンに添加した。(a)において (リバーゼ イムノプロット)、レーンは以下を含んでいた：

- A P. エバシア由来の精製リバーゼ
- B 細胞内百分
- C ペリプラズマ百分
- D 細胞外百分；

(b)において (Lip イムノプロット)、レーンは以下を含んでいた：

- A pJ38より発現されたLip
- B 細胞内百分
- C ペリプラズマ百分
- D 細胞外百分；

図12はプラスミドpAHE19を示し；

図13はプラスミドpAHE22を示し；

図14はプラスミドpAHE16を示し；

図15はプラスミドpAHE23を示し；そして

図16はプラスミドpCBE1-6を示す。

本発明を下記の実施例で更に説明するが、これらは本発明の請求の範囲を限定することはない。

方法および材料

大腸菌 TG1 ^{supE} *hsd-S thi-(lac-proAB) F' [traD36proAB+lacIq lacZ-M15]* (Gibson, 1984)

大腸菌 JA221 (Clarke and Carbon, 1978)

大腸菌 BL21 (DE3) 8株リソゲン, *placUV5-T7 RNApol* (IPTG 誘発性) (Studier, 1990)

プラスミド

pSJ150-Jorgensen et al. (1991)

pJW2-Wang et al. (1990)

pET3a-Rosenberg et al. (1987)

pT7-7-Stax Tabor, Dept. of Biol. Chem., Harvard Medical Schoolより入手

pLysE と pLysS-pACYC184::ptet及び対立配向由来のT7リゾチーム (Studier, 1990)。

一般方法

標準DNA操作は、本質的にSambrookら (1989) に記載の通りに実施した。

制限酵素、T₄ DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI (クレノウフルグメント) はBoehringer Mannheim 又はPromegaより入手し、そしてその供給者の推奨の通りに用いた。

ニワトリ卵白リゾチームはSigmaより入手した。

プラスミドの調製及び大腸菌の形質転換はSambrookら (1989) に記載の通りに実施した。

Sambrookら (1989) に記載の通りにSDS-ポリアクリルアミドゲルを用意し、電気泳動し、そして染色した。

タンパク質分子量マーカーはSigmaより購入した。

リバーゼ分析

リバーゼ活性は、グリセロールトリプチレート又はオリーブ油エマルジョンのいづれかと、ブリリアントグリーンを含むプレート上で検出した。リバーゼ活性は基質としてグリセロールトリプチレートを用いてpH-スタット法により測定した。1LU (リバーゼユニット) は、下記の条件のもとで1分あたり1 μmolの溶定可能な酵素を遮離せしめる酵素の量である:

温度 30.0°C

pH 7.0

乳化剤 アラビアゴム, 50ml/1

(Jorgensenら、1991)。

リバーゼスクリーニングアッセイはマイクロタイターディッシュの中で下記の手順に従って実施した:

まず試験液を作る:

17.9 g のNaCl + 0.41 g のK₂HPO₄ + 6.0 g のアラビアゴム + 540 ml

のグリセロールを、脱ミネラル水で1000mlの最終容量にする。

リバーゼアッセイ試験を下記の通りに作る:

12.5mlの上記の乳化試験 + 3.75mlのグリセロールトリプチレート + 0.25mlのブリリアントグリーン (pH 9.0 中で40mg/ml) + 50mlの10 mMのトリス pH 9.0 をUltra Turrax乳化器の中で1分間乳化させる。

実際のアッセイは、100 mlのこのアッセイ試験を100 mlのリバーゼサンプルと混合することにより実施する。発色を、既知のリバーゼサンプルのそれと比較した。

ブリリアントグリーンプレートは15mlのLBアガーより成り、10%のオリーブ油エマルジョン0.3mlと蒸留水中の40mg/mlのブリリアントグリーン溶液0.1mlとを含む3mlのLBアガーハイブリッドを有する。オリーブ油エマルジョンは、オリーブ油10ml + アラビアゴム1 g + 脱イオン水90mlであり、Ultra Turrax乳化器を用いて混合した。高レベル発現のための大腸菌培養物の調査

(a) pHE2をベースとするプラスミド

一夜培養物をオービタルシャーカーの中で250 rpm で30°Cで増殖させ、1:100に希釈し、そして0.5のA600が達せられるまで30°Cで3~4 hr増殖させた。1組のデュプリケート培養物のうちの一方をタンパク質合成の調査のために42°Cに移した。両培養物からサンプルを、誘発後0, 30, 60, 90及び120分において取った。

(b) pHE3a/pET-7cをベースとするプラスミド

一夜培養物をオービタルシャーカーの中で250 rpm で30°Cで増殖させ、1:50に希釈し、そして0.5のA600が達せられるまで30°Cで増殖させた。1組のデュプリケート培養物のうちの一方にIPTGを1.5 mMの最終濃度となるまで加えた。IPTGの添加の15min後に、誘発培養物にリファビシンも100 μg/mlの最終濃度となるように加えてよい。両培養物から、誘発後0, 30, 60, 90及び120分の時間

においてサンプルを取った。

タンパク質サンプルの処理及び調製

サンプルを直ちに0°Cに冷やした。細胞をマイクロ遠心機で12,000 g, 5分、4°Cでの遠心により回収した。細胞ベレットをラエミリサンプルバッファーの中に再懸濁させ、そして-20°Cで凍結した。タンパク質をその上清液から、等容量のアセトンの添加、及び氷上で30minの放置、それに続く15min, 12,000 g, 4°Cでの遠心により沈殿させた。沈殿タンパク質をラエミリサンプルバッファーの中に再懸濁し、そして-20°Cで凍結した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるタンパク質の分析

タンパク質サンプルを、12%のSDS-ポリアクリルアミドゲルに載せる前に5 min 煮沸した。ゲルをトリス-グリシンの中で、染色先端がゲルの端に到達するまで電気泳動し、そして0.25%のクマジーブリリアントブルーで染め、次いで10%の酢酸の中で脱色した。

ウエスタン分析

利用した方法はTowbinら (1979) のそれと同様である。タンパク質サンプルを12%のSDS-ポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動し、そしてニトロセルロースに電気泳動的に転写させた。フィルターをブロッキングバッファーとブレインキュベートし、次いで抗リバーゼ抗体とインキュベートした。次にアルカリホスファターゼコンjugate化、ヤギ抗-ウサギIgG (Sigma) をフィルターとインキュベートした。ニトロブルーテトラゾリウムと5-ブロモ-4-クロロ-1-インドイルヌスフェート (共にSigma由来) を用いてタンパク質を識別化させた。

細胞溶解のための方法: Harston (1987) から採用

一夜培養物を100 mlのLB培地に1:100に希釈し、次いで0.5のOD600 値へと増殖させた。pHE2 及びpHE10のケースにおける熱に

よる、並びにpCBEG のケースにおけるIPTGによる誘発を2時間行った。その培養物を次に500 gで15分、4°Cで遠心した。その上清液を除き、そしてそのペレットを秤量した。大腸菌細胞の各グラム (ウェット重量) に対して3mlの溶解バッファーを加え、そしてそのペレットを再懸濁させた。溶解バッファーは50 mMのトリス、Cl, 1 mMのEDTA、100 mMのNaClを含んでいた。

細胞の各グラム当たり、8mlの50 mMのPMSFストック及び80 μlのリゾチーム (10mg/ml) を加え、そして20分攪拌した。4 mlのデオキシコール酸を細胞のグラム当たりに連続攪拌しながら加えた。そのリゼートを37°Cに置き、そしてガラス棒で攪拌した。そのリゼートが粘稠となったら、20 μlのDNase I (1mg/ml) を細胞のグラム当たりに加えた。そのリゼートをもはや粘稠でなくなるまで室温で放置した (約30分)。そのリゼートを次いで必要となるまで4°Cで保存した。

封入体の精製及び洗浄: (Marston ら、1984)

細胞リゼートを12,000 g, 15分、4°Cで遠心した。その上清液をデカントし、そしてそのペレットを、0.5%のトリトン及び10 mMのEDTAを含む9容量の溶解バッファー (pH 8.0) の中に再懸濁させた。室温で5分保存後、12,000 g, 15分、4°Cで遠心した。その上清液をデカントし、そして横に置き、そしてそのペレットを100 μlのEDTAに再懸濁させた。その上清液及び再懸濁ペレットから10 μlのサンプルを取り、そして10 μlの2XのSDS-ゲル装置用バッファーと混ぜ、そしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析して、調査のタンパク質のほとんどがペレット中にあるかを調べた。pHE2 のリバーゼ活性がペレット部分の中にはほとんどあるかを調べるためにリバーゼスクリーニングアッセイも実施した。

持表平7-504561 (9)

封入体の可溶化及び再生：(Marston ら (1984) より採用)
0.1 mMのPMSF (加えたばかり)、8 Mの尿素 (胍イオン化) 及び
0.1 Mのベーターメルカプトエタノールを含む100 μlの溶解バッファーを洗浄したペレットに加え、そして室温で1時間保存した。
リバーゼ活性スクリーニングアッセイは、タンパク質が全体的に変性したことに基づいてリバーゼ活性が消失したかどうかを調べるために実施した。50 μl 1つの変性タンパク質サンプルを透析用チューブに入れた。タンパク質サンプルを50 mMのKH₂PO₄ (pH10.7)、1 mMのEDTA (pH8.0)、50 mMのNaCl、並びに8 Mの尿素及び0.1 MのBMEも含むバッファーの中で透析した。pHはKOHで10.7に保っておいた。8 Mの尿素の中での最初の透析は一夜行った。低めの濃度の尿素 (即ち、6 M : 4 M : 2 M : 0 M) を用いる異なる透析はBME抜きの上記のバッファーの中で行った。これらの透析反応体のpHはKClを用いて8.0に保っておいた。異なる濃度の尿素それぞれの中での透析は6時間行った。コントロール実験として、デュブリケートのサンプルを上記の通りに実施したが、ただし尿素とBMEは無しで行った。

変性サンプルを透析チューブから取り出し、そしてこれらのサンプルのリバーゼ活性をグリセロールトリプチレート及びブリリアントグリーンプレート上で調べた。そのリバーゼ活性も、マイクロタイマー-リバーゼスクリーニングアッセイを用いて検査した。

SDS-ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収
SDS-ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質の回収の手順はRager と Burgess (1980) に記載してある。タンパク質サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動させた。電気泳動後、そのゲルをトレイに移し、水ですすぎ、そして氷冷の250 mMのKCl及び1 mMのDTTで10分間温めた。そのゲルを1 mMのDTTを含む冷水で

脱色し、次いで対象のタンパク質バンドを切り取った。(ゲルの一部はクマジーブルーで染めて、適正なバンドを切り取ったかを確認するために分子量標準品を染めた)。そのゲルをC18の針の付いた1 mlのシリジンを通じて破砕し、そして0.1%のSDS、50 mMのトリス/ HCI (pH7.9)、0.1 mMのEDTA、5 mMのDTT及び200 mMのNaClを含む1 mlの溶離バッファーを加えた。タンパク質を、時折り搅拌しながら、25°Cで少なくとも1時間溶離させた。その混合物を簡便に遠心して破砕ゲルをペレット化させた。そのタンパク質を上清液から、4 等量の冷アセトンを加え、次いで-70°Cで20 min インキュベートすることにより沈殿させた。沈殿タンパク質を遠心し、そしてそのペレットを乾した。

ウサギの中での抗-LimA抗血清の作製

LimAに対する抗体を発生させるため、3羽のウサギに精製LimAタンパク質を、Väistö (1981) に述べられているのと類似のスケジュールに従って注射した。LimAタンパク質を精製SDS-ポリアクリルアミドゲルから精製した。1日目において、10 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.2 中のLimAを完全フロインドアジュバントと混ぜ、そして各ウサギの背中に10箇所において皮内注射した。21日目には、不完全フロインドアジュバントと混ぜたブースター注射を各ウサギの足に筋肉内注射した。同一のブースターを同じようにスケジュールの31日目に注射した。試験血は抗-LimA抗体が作製されたことを示した。

培地

LB

リッター当たり：10 g のバクトートリプトン

5 g のバクトーリン母抽出物

10 g のNaCl

プレートは2%のアガードを含んだ。

実施例

例1

高レベルのLimA発現のための構築

(a) lipA+limA:pAH82 と pAH82

プラスミドpAH82 (図1) を、pSJ150 (Jørgensen ら、1991) 由来のlipA+limAの両者をエンコードする2.264 kbのNdeIフラグメントをNdeI-消化pJH2 (Nane ら、1990) にサブクローンすることによって構築した。リゲーション体を大腸菌T₁G1に30°Cで形質転換せしめ、次いで適正な配向においてインサートを有するプラスミドを同定するためにDNAミニ調製品を利用した。pAH82は獲得したいつかの適正な構築体のうちの一つである。pAH82において、リバーゼ遺伝子の開始コドンはファージT7リボソーム結合部位のすぐ下流にある。

E57はpAH82で形質転換した大腸菌株JA221である。E57を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リバーゼタンパク質がSDS-ポリアクリルアミドゲル上で同定でき (ウェスタン分析により)、そしてリバーゼ活性がブリリアントグリーン及びグリセロールトリプチレートプレート上で、並びにマイクロタイマー-アッセイ及びpHスタット法により検出された。

プラスミドpAH88 (図2) は、pAH82由来のlipA+limAをエンコードする2.264 kbのNdeIフラグメントを、NdeIで消化しておいた発現ベクターpET3aにサブクローンすることによって構築した。リゲーション体を大腸菌株T₁G1に形質転換せしめ、そしてプラスミドDNAをその形質転換体から調製して適正なプラスミドを同定した。

E73はpAH88で形質転換された大腸菌株BL21 (DE3) pLys Sである。E73を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、

リバーゼタンパク質 (およびそのHN34KD) がSDS-ポリアクリルアミドゲル上で認められ、そしてリバーゼ活性がブリリアントグリーン及びグリセロールトリプチレートプレート上で、並びにマイクロタイマー-アッセイで検出された。

(b) lipAを伴わないpAH810

プラスミドpAH810 (図3) は、LimA遺伝子のコード領域の2/3が欠失しているpAH82の説明体である。プラスミドpAH810は、pAH82を制限酵素ClaI及びNotIで消化し、統いてマングビーン (Mung Bean) スクレアーゼで処理することによって構築した。サイズは3 kbのDNAを、エチジウムプロミドで染めたアガロースゲルからバンドとして切り出した。DNAをGene Cleanキットを用いて精製し、リゲートし、そしてコンビナント大腸菌T₁G1に形質転換せしめた。プラスミドDNAミニ調製品を適正なクローニングを同定するために用いた。

E68はpAH810で形質転換された大腸菌株JA221である。E68を高レベルのタンパク質生産のために誘発せしめたとき、リバーゼタンパク質は、pAH82由来のものと同量でSDS-ポリアクリルアミドゲル上及びウェスタン分析により認められたが、リバーゼ活性は検出されなかった。

例2

高レベルのLimA発現のための構築：pCBE6, pCBE7, pCBE12, pCBE18及びpCBE19

LimAのみが発現されるプラスミドpCBE6 (図4) を、pSJ150由来の1.17 kbのClaI-SphIフラグメントをプラント末端フラグメントとして、NdeIで消化し、次いでプラント末端を作り上げるためにクレノウで処理しておいた発現ベクターpET3aにサブクローンすることによって構築した。大腸菌株BL21はpCBE6で形質転換された株BL21 (DE3) pLys Sである。

プラスミドpCBE7 (図5) は、同じ1.2 kbのCstI-SphIフラグメントを発現ベクターpT7-7にサブクローンすることによって構築した。E103はpCBE7で形質転換されたBL21 (DE3) pLys Sである。E102及びE103の誘発により、約32KDの分子量のタンパク質が観察された。

プラスミドpCBE12 (図6) は、pCBE7のBgl II-BamH I フラグメントをpACYC177にサブクローンすることによって構築した。Lis I は、pSJ518 (M090/00908のFig. 3に記載) から発現されたりバーゼに対してトランスにおいてpCBE12から発現し、そしてpABE10はリバーゼ活性をもたらしめた。

プラスミドpCBE18及び19 (図7及び8) は、pCBE7のBgl II-BamH I フラグメントをpLys SのBamH I部位にサブクローンすることによって構築した。Lis I はpABE10由来のリバーゼに対してトランスでpCBE18及び19から発現し、リバーゼ活性をもたらしめた。

例3

高レベルのタンパク質発現を獲得するための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのLipA及びLis Iの両者を生成せしめた。大腸菌株E57 (JA221/pABE2) 及びE68 (JA221/pABE10) を30°Cで250 rpmにて一夜増殖させた。その培養物を1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで30°C, 250 rpmで増殖させた。次にその培養物を42°Cで増殖するようにした。大腸菌株E102 (BL21 (DE3) pLys S/pCBE6) は37°Cで一夜増殖させ、1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで増殖させた。次いでIPTGをこの培養物に1.6 mMの最終濃度となるまで加えた。15分後、リファンビシンを最終濃度100 μg/mlとなるまで加えた。その培養物を37°Cでインキュベートし、且つその増殖中250 rpmで振った。各培養物を誘発の60, 90及び120分目において取った。

Hager と Burgess (1980) 記載の方法により調製した。サンプルは12%のSDS-PAGEにより分けた。電気泳動後、そのゲルをトランスファーパッファー (10 mMのCAPS, 10%のメタノール, pH 11) に20 min 浸した。そのゲルを、100%のメタノール (5~10秒) 及び蒸留水 (2 × 1 min) で予備処理しておいたプロプロット上にエレクトロプロットし、次いでトランスファーパッファーに浸した。エレクトロプロットをトランスファーパッファーの中で窓温で3時間、200 mAで実施した。プロットをサンドイッチから取り出し、蒸留水、次いでメタノールの中ですすいだ (5~10秒)。次にそのプロットを1% (v/v) の酢酸、60% (v/v) のメタノール中のアミドブラック (0.1% w/v) の中に1 min 染色した。そのプロットを蒸留水を順次に交換しながらすすぎ、風乾し、次いで紙の窓の間で-20°Cで保管した。Lis I及びアレリバーゼに相当するバンドを切り出し、そしてApplied Biosystems 477A タンパク質シーケンサーで直接配列決定した。

下記の配列が得られた。

Lis I (pCBE6) : TARGGEAPL-BRAVVYGAVG (SEQ ID NO 6)
preLipA (pABE2) : ARTHRSRVVAGAVV-ANSA (SEQ ID NO 7)
preLipA (pABE10) : ARTHRSRVVAGAVV-AN-IA (SEQ ID NO 8)

N-末端メチオニンが削除されていることを除き、その配列はDNA配列から推定したLis I及びpreLipAについての予測通りの配列であった。

方法の欄に記載の通りに、ポリクローナル抗体を発生するためにゲル精製Lis Iタンパク質を使用した。

タンパク質の純度を更なるSDS-PAGE分析によりチェックした。

サンプルを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、及びリバーゼに対して発生せしめた沈澱液を用いるウェスタン分析により分析した。図9及び10を参照のこと。リバーゼタンパク質はpABE2又はpABE10のいづれかを含む株において両量で誘発されることが観察された。大多数の約95%のリバーゼが、シュードヌクセバシより単離された成熟リバーゼより大きく、そしてそのサイズは完全アレリバーゼについて予測されるそれと一致した。マイクロタイターラッセイによってリバーゼ活性についてもサンプルをアッセイした。リバーゼ活性はE57の培養物 (pABE2, lipA+lisI) から観察されたが、E68 (pABE10, lipAのみ) 又はE102 (pCBE6, lisI) の培養物からは観察されなかった。

結果が示すには、リバーゼタンパク質はlisI遺伝子の存在下及び非存在下において両量で作られるが、しかしlisIの非存在下ではリバーゼ活性は検出されなかった。活性リバーゼはlisI遺伝子も存在しているときにのみ生産された。

例4

LipA 及びLis I の精製

JA221/pABE2 : JA221/pABE10 : BL21/pLys S/pCBE6及びBL21一夜培養物を100 mlのLB培地に1:100に希釈し、そして0.5のOD600 倍に増殖させた。pABE2 及びpABE10の場合における熱による誘発、並びにpCBE6の場合におけるIPTGによる誘発を2時間実施した。次にその培養物を500 g, 15分、4°Cで遠心した。

細胞を記載の方法により溶解放せしめた。Lis Iタンパク質は細胞リゼートの可溶性画分の中で見い出された。リバーゼは封入体において残っていることが見い出された。封入体はHarstonら (1984) より採用した方法により用意した。純粋なリバーゼ及びLis Iタンパク質を、封入体及び可溶性リゼート画分それぞれのSDS-PAGEを経て、

例5

pABE2 及びpABE10 LipA の変性及び再生

変性/再生実験を、pABE2 又はpABE10のいづれかに由来のLipA (封入体の中にある) と、Lis I (pCBE6、そして細胞リゼートの中にある) とにより実施した。60 μlの封入体を様々な容量のpCBE6細胞リゼート (0~30 μl) と混ぜ、そして8Mの尿素の中で一晩に可溶化させた。再生は、濃度の低まっていく尿素に対する透析により実施した。実験は5%のグリセロールの存在下及び非存在下で実施した。リバーゼ活性をpHスケートを利用して測定した。

実験結果は (下記に示す)、リバーゼ活性の%の上昇は、増加していくLis Iの量の存在下での変性/再生により回復すること、及びグリセロールの存在はリバーゼ活性の回復に影響しないことを示唆した。

pABE2 及びpABE10 LipA についての結果

封入体未希釈 : リゼート由来のLis I	
pABE2 (pJW2 :: lipA/lisI) について	- 7.5 LU (容量60 μl)
測定された初期リゼート活性	
pABE10 (pJW2 :: lipA) について	- 0 LU
測定された初期リバーゼ活性	

特許平7-504561 (14)

この実験の結果は(下記に示す)、変性/再生反応におけるLipAの量の上界は、リバーゼ活性の回復率の初期上界をもたらすことを示唆する。更なる量のLipAの反応への付加は阻害的である。

pAHE2 及び pAHE10 LIPA バーゼについての結果

封入体は1:10に希釈; リゼート由来のLipA

透析サンプル 回復したリバーゼユニットの値

pAHE2 10 μl	0.4
“ + 10 μl LipA	5.6
“ + 15 μl LipA	5.7
“ + 20 μl LipA	4.5
“ + 30 μl LipA	9.5
“ + 40 μl LipA	3.2

pAHE10 10 μl	0.0
“ + 10 μl LipA	2.5
“ + 15 μl LipA	7.8
“ + 20 μl LipA	7.3
“ + 30 μl LipA	3.8
“ + 40 μl LipA	0.5

例 7

シードモナス セバシア DSM 3959 由来のリバーゼ及びブレリバーゼ

P. セバシア DSM 3959 (それよりLipA及びLipBをクローニングした株)を誘導して、80g/lのオレイン酸アルコールを添加したLB培地の中での増殖によりリバーゼを生産させ、次いで細胞外、ペリプラズマ及び細胞内画分を New と Kappel (1965) に記載の通りに単離し

例 6

pAHE2 及び pAHE10 LipA の変性及び再生

この一式の実験のために、封入体画分を1:10に希釈した。pAHE2 及び pAHE10 (LipA) 封入体並びに pCB66 (LipA) 細胞リゼートのサンプルを SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。変性/再生実験において用いたタンパク質の量を判定するために Biorad タンパク質アッセイを利用した。10 μl の pAHE2 封入体は 10 μg のタンパク質を含むことが決定された; 10 μl の pAHE10 封入体は 8 μg のタンパク質を含んでいた; そして 10 μl の pCB66 リゼートは 25 μg の純タンパク質を含んでいた。

た。

イムノプロット (図11) 及びリバーゼ活性分析は、細胞外画分は活性な成熟リバーゼのみを含み、一方、細胞内画分は不活性なブレリバーゼのみを含むことを示した。

タンパク質%

画分	リバーゼ活性	ブレリバーゼ	リバーゼ
細胞内	-	100	ad
細胞外	+	ad	100

LipAが大腸菌BL21 (DE3) pLys S pCB66 の抽出物として供されたとき、P. セバシア由来の成熟細胞外リバーゼは LipA の存在下においてのみ、変性/再生後に定量的に再活性化されることができた。同一の実験において、LipAを伴って又は伴わないで細胞内ブレリバーゼを利用したときは、下記の表から明らかに過剰リバーゼ活性は認められなかった。

細胞内画分 (ブレリバーゼ)	変性前のLU	再生後のLU
20 μl + 0 μl LipA	0.0	0.0
20 μl + 10 μl LipA	0.0	0.0
20 μl + 20 μl LipA	0.0	0.0
20 μl + 30 μl LipA	0.0	0.0
20 μl + 30 μl 無-LipA リゼート	0.0	0.0
細胞外画分 (成熟リバーゼ)		
20 μl + 0 μl LipA	1.5	0.0
20 μl + 10 μl LipA	1.5	0.4
20 μl + 20 μl LipA	1.5	0.8
20 μl + 30 μl LipA	1.5	1.3
20 μl + 30 μl 無-LipA リゼート	1.5	0.0

再生実験中のLipAによる、P. セバシア由来のブレリバーゼではなくリバーゼの活性化は、大腸菌の中で生産されたリバーゼタンパク質を利用しての結果と一致した。大腸菌リバーゼサンプルは約5%の成熟タンパク質及び95%のブレリバーゼより成る。変性前 (pAHE2のみ) 及び再生後 (pAHE2 及び pAHE10) に観察されたりバーゼ活性の値は、SDS - PAGEで認められたリバーゼタンパク質の純度より予測される値のほぼ5%に相当した。

例 8

成熟LipAタンパク質の発現のための構築

シグナルペプチドを欠く形態、即ち成熟リバーゼとしてリバーゼLipAが発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リバーゼをエンコードするLipA遺伝子の改変バージョン、それに続くLipA遺伝子を含むpAHE19 (図12)、及びLipA抜きの成熟リバーゼをエンコードするpAHE22 (図13)である。それらは下記の通りに構築した:

下記のDNA フラグメントを合成した (標準方法):

(MspI) < HindIII

5' - CGCGTAACTTCACATTGAAAGGGGAGGGAAATCATGGCC -
3' - ATTCCGAAGTCTAACCTTCTCCCTCTTCTAGTACCGG -

< MspI >

GCTGGCTACGGCGGGA - 3' (SEQ ID NO 9)

CGACCGATGCGCCGCTGGCG - 5' (SEQ ID NO 10)

このDNA フラグメントは基本的には、バチルス リシュニホルニス asyLリボソーム結合部位及び開始コドンを、成熟LipAタンパク質のN末端由来のアミノ酸MNGYAA (SEQ ID NO 11) をエンコードする配列の前に含む。

このDNA フラグメントを、MspI消化pSJ420 (W090/00908に記載の pSJ416と同一) にリゲートし、そしてpSJ38をプラスミドとして単

離した。その中の合成DNA フラグメントにおけるNdeIⅢ部位はpSJ420上のasyLプロモーターに近位する。

pSJ838はasyLプロモーター、asyL RBS、lipAの最初の6コドンに適合したasyLシグナルペプチド、asyL RBS、成熟lipA及びlimAを保有する。

pSJ838からの組換により (Jorgensen ら、1990に本質的に記載の通り) プラスミドpSJ897を獲得し、これはasyLプロモーター、asyL RBS 及び成熟lipA、それに続くlimAを含む。pSJ897上のasyL RBSからのすぐ上流に制限酵素NdeIに関する認識配列がある。

pAHE19を、pJM2の4.9kbのNdeI-EcoRI フラグメント、pSJ897の0.46kbのNdeI-BamHI フラグメント及びpSJ150の2.07kbのBamHI-EcoRI フラグメントのリゲーションにより構築した。

pAHE22をpAHE19から、CiaI+NotI消化及びリゲーション、それに続く末端をプラント化するためのエクソスクレアーゼSI処理により構築した。

誘発に際し、pAHE22を含む大腸菌JA221 からではなく、pAHE19を含む大腸菌JA221 からリバーゼ活性が認められた。

例9

LimAを伴う及び伴わないでの成熟lipAの変性及び再生

成熟リバーゼを、方法において記載した細胞の誘発、濾液及び溶解を経た可溶性画分として用意し、そして方法において記載した通り、LimA含有細胞リゼートの存在下及び非存在下での変性/再生実験において利用した。

この実験の結果(下記の表)、LimAの存在下で大腸菌で生成された成熟lipAのみが、活性リバーゼ酵素をもたらしめるように再生されうることを示した。

ンから3塩基対下流に位置する。

lipDをエンコードするDNA 配列をSEQ ID NO 1 に、そしてSEQ ID NO 3に対応のタンパク質配列を示す。lipDをエンコードするDNA 配列をSEQ ID NO 2 に、そしてSEQ ID NO 4 に対応のタンパク質配列を示す。

lipAとlipDのアミノ酸配列の整合研究より、lipDアミノ酸配列が推定できない5つの箇所に加えて、酵素の成熟部において22箇所の相違があった。

lipAとlipDのアミノ酸配列の整合研究により、lipDのアミノ酸配列が推定できない2つの箇所に加えて、32箇所の相違があった。

これらの研究に基づき、lipDとlipA、及びlipDとlimAは相異性ではあるが、しかしながら異なるリバーゼ及びリバーゼ調節因子タンパク質であることが明らかとなった。

従って、limAが変性/再生実験においてlipDを活性化できるかが課題となつた。

例11

P. セバシアから精製したlipDによる変性/再生実験

株7510-A (DSM 3401) 由来のlipDを、標準のタンパク質精製法を利用して、DSM 3401からの部分精製タンパク質として用意した。

limAの存在下及び非存在下で、株7510-Aの由来のリバーゼを用いて変性/再生実験を行った。18LUを、複数の比のlimAにより変性及び再生し、そして回復リバーゼ活性を測定した。リバーゼ活性はpH スタットで測定した。コントロールとして、原素の非存在下でも実験を行つた。

結果が示すには、7510-AリバーゼをlimAの非存在下で変性及び再生すると、リバーゼ活性は有効に回復しなかった。高めたレベルのlimAを7510-Aリバーゼに加えると、高めたレベルのリバーゼ活

pAHE19: 成熟lipA, LimA.
pAHE22: 成熟lipA.

	変性前のLU	変性後のLU
pAHE19(100 μl)	0.5	0.5
pAHE19(100 μl) + LimA (10 μl)	0.5	0.5
pAHE19(100 μl) + LimA (20 μl)	0.5	0.75
pAHE19(100 μl) + LimA (30 μl)	0.5	0.75
pAHE19(100 μl) + 無-LimA リゼート (30 μl)	0.5	0.25
pAHE22(100 μl)	0.0	0.0
pAHE22(100 μl) + LimA (10 μl)	0.0	0.5
pAHE22(100 μl) + LimA (20 μl)	0.0	0.75
pAHE22(100 μl) + LimA (30 μl)	0.0	0.75
pAHE22(100 μl) + 無-LimA リゼート (30 μl)	0.0	0.0

例10

P. セバシア DSM 3401からのlipD及びlimDのクローニング及び配列
株75-10A とも呼んでいるP. セバシア、DSM 3401の別の单離体は、DSM 3401由来のlipAに類似リバーゼを生成する。

DSM 3401由来のリバーゼエンコードDNA のクローニング及び配列決定 (WO90/00908に記載の標準方法を採用) は、lipD及びlimDに対して比較的高い相異性を有する以降lipD及びlimDと呼ぶ二つの遺伝子を示した。

極端なるDNA のGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っている—lipD遺伝子における4位、及びlimD遺伝子における2箇所の位置。

lipD開始コドンは、lipD及びlimDの場合のように、lipD停止コド

性が認められた。しかしながら、回復したリバーゼ活性の%は非常に低いままであった。

7510-Aリバーゼについての結果

13,000LU/mlのストックを使用；リゼート由来のlimA サンプルは透析	LUの標準 活性	回復した LUの値 (+UREA)	%回復率
7510A 15 μl	18	0.25	1.4
7510A " + 5 μl LimA	18	0.25	1.4
7510A " + 10 μl LimA	18	0.4	2.2
7510A " + 15 μl LimA	18	0.35	2.0
7510A " + 30 μl LimA	18	0.45	2.5

リバーゼ活性の低い回復率についての説明は後にする。特定の製品中のリバーゼは、変性/再生の際に劣化することが認められ、従って実験を、DSM 3401由来のリバーゼ及び誘発したBL21 (DE3) pLys S pCBBG由来のlimAの新たな部分精製調製品で繰り返した。以下の結果は、limAがlipDをよく活性化できることを示す。

変性前LU	再生後LU	%回復率
lipD (10 μl) +	80	0.1
lipD (10 μl) + 5 μl LimA	80	44
lipD (10 μl) + 10 μl LimA	80	45
lipD (10 μl) + 20 μl LimA	80	56
lipD (10 μl) + 30 μl LimA	80	55
lipD (10 μl) + 40 μl LimA	80	53

例12

lipDの発現のための構築

lipD配列は成熟lipA配列における7個のアミノ酸に対応する位置

特表平7-504561 (13)

イブリドリバーゼを活性化できることを示す。

	変性前のOLU	再生後のOLU
pABE16 (30 μl) +	0.5	0.5
pABE16 (30 μl) + LimA (10 μl)	0.5	0.75
pABE16 (30 μl) + LimA (20 μl)	0.5	0.75
pABE16 (30 μl) + LimA (30 μl)	0.5	0.75
pABE16 (30 μl) + LimA (40 μl)	0.5	1.0
pABE16 (30 μl) + 無-LimA 細胞リザート (40 μl)	0.5	0.5
pABE23 (30 μl) +	0.0	0.0
pABE23 (30 μl) + LimA (10 μl)	0.0	0.75
pABE23 (30 μl) + LimA (20 μl)	0.0	0.75
pABE23 (30 μl) + LimA (30 μl)	0.0	1.0
pABE23 (30 μl) + LimA (40 μl)	0.0	1.0
pABE23 (30 μl) + 無-LimA 細胞リザート (40 μl)	0.0	0.0

例14

Lip-Lim 融合体の構築

プラスミドpSJ721はpSJ377の欠失導体であり、その15bpはCtaI部位において消失しており、lipAの停止コドン及びlimの最初の3個のアミノ酸についてのコドン (Jorgensenら、1981) を欠いている。従って、pSJ721は、lipAのC末端においてのSphI部位に続く8個のアミノ酸に融合されたlimタンパク質をエンコードする。pJJ721の838 bpのSphI-HotIフラグメント (これはlimの大部分に融合したlipAのC末端を含む) 及びpSJ150の915 bpのHinfI-HotIフラグメント (これはリザートコード配列の大部分を含む) を、HinfI及びHotIで消化しておいたpABE8にリゲートし、lip-lim 融合プロ

スミドを作った。lim遺伝子の始まりにおいて通常存在しており、且つpSJ721になく、そしてlip-lim 融合プラスミドにおいてないべきであるCtaI部位の消失について形質転換体をスクリーンした。制限酵素分析からいくつかのプラスミドが適正であることが認められた。そのうちの6個をpCBEI-6と命名した (図16)。

大腸菌BL21 (DE3) pLys S を各融合プラスミドにより形質転換させ、次いでその形質転換体を増殖させ、そしてIPTGで誘発した。トリプチリンプレートでのプレート及び培地サンプルにおける活性の分析は、これらのプラスミドが誘発に基づきリバーゼ活性を示すことを示した。細胞及び培地の両者に由来するタンパク質サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル及び抗リバーゼ抗血清を用いるウエスタン分析により分析した。サイズにおいてpABE2 又はpABE8 により生成されたプロセスを受けでないリバーゼと同一であるリバーゼタンパク質のみが検出された。誘発実験のタイムコースの初期に採取したサンプルにおいても、期待の高分子量のタンパク質は認められなかった。おそらく、人工lip-lim 融合体はタンパク質の連結部でタンパク質分解を特に受け易いのであろう。

文献

Clarke, L. and Carbon, J. (1978) J. Mol. Biol. 120, 517-534.

Ellis, R. J. & van der Vies, S. M. (1981). Annual Review of Biochemistry 60, 321-347.

Heger, D. A. and Burgess, R. R. (1980) Elution of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulphate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase and other enzymes. Anal. Biochem. 109, 76-86.

Jorgensen, S., Skov, K. W. and Diderichsen, B. (1991) Cloning, sequence and expression of a lipase gene from *Pseudomonas capsici*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. J. Bacteriol. 173, 559-567.

Horston, P. A. O. (1987) The purification of eukaryotic polypeptides expressed in *E. coli*. In DNA Cloning: A practical approach (ed D. M. Glover), vol. 3, p. 59. IRL Press, Oxford.

Horston, P. A. O., P. A. Lowe, M. T. Doel, J. M. Schoemaker. 1984. Purification of calf prochymosin synthetized in *E. coli*. Biotechnology 2 : 800.

Rosenberg, A. M., Chui, D. S., Liu, S.-W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene 56 125-135.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition

Valiukaitis, (1981) Methods in Enzymology 21, 46-52

Wang, X., McConnell, B. J. and O. Mahony, D. J. (1990)
An efficient temperature-inducible vector incorporating the T7
gene 10 translation initiation leader region. *Nucleic Acids
Res.* 18, 1070.

Neu, R. C., Heppel, L. A. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 3685-
3692.

Jorgensen, P. L., Hansen, C. K., Poulsen, G. B., Diderichsen,
B. (1990). *Gene*, 98, 37-41.

S. Aoyama & *PLBS Letters* 212 (1), December 1988, pp. 36-40

W. Kusielka & *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141 (1), November
26, 1988, pp. 185-190

R. J. Ellis and S. M. Hemsingaen, *Irends Biochem. Sci.* 14,
1989, pp. 339-342;

J. B. Rothman, *Cell* 59, 1989, pp. 591-601

R. Morimoto & in *Stress Proteins in Biology and Medicine*, R.
Morimoto, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor, NY, 1990, pp. 1-36)

Sambrook & *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold
Spring Harbor, 1989

S. L. Beaucage and M. W. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22,
1981, pp. 1859-1869.

Matthes & *EMBO Journal* 3, 1984, pp. 801-805

以下の配列において

SEQ ID NO 1 は *lipD* のスクレオチド配列であり；
SEQ ID NO 2 は *lipD* のヌクレオチド配列であり；
SEQ ID NO 3 は *lipD* のアミノ酸配列である。その配列はプレリバーゼのそれであり、成熟リバーゼの第1アミノ酸残基は A である
(アミノ酸残基 45)。
SEQ ID NO 4 は *lipD* のアミノ酸配列であり；
SEQ ID NO 5 は *lip-lip* 整合遺伝子のスクレオチド配列であり；
SEQ ID NO 6-8 は例 4 に説明したペプチドフラグメントであり；
そして
SEQ ID NO 9-11 は例 8 に示すスクレオチド及びアミノ酸配列であ
る。

配列表

(1) 一般情報: ノボ ノルディスク A/S

(i) 出願人:

(A) 名称: ノボ ノルディスク A/S

(B) 通り: ノボ アレ

(C) 市: バグスバード

(E) 国: デンマーク

(F) 郵便番号: DK-2880

(G) 電話: +45 44448888

(H) テレファックス: +45 4449 3256

(I) テレックス: 37304

(ii) 発明の名称: 活性リバーゼの製造のための方法

(iii) 配列の数: 11

(iv) コンピューター読み取り方式:

(A) 媒体のタイプ: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC コンパチブル

(C) 作動システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0、
バージョン #1.25 (EPO)

(vi) 先の出願のデータ:

(A) 出願番号: WO PCT/DK91/00402

(B) 出願日: 1991年12月20日

(2) SEQ ID NO:1 についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1092 横基対

(B) 種類: 核酸

(C) 残の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖

(ii) 分子の型: DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメントの型: 内部

(vi) 起源:

(A) 生物: シュードモナス セバシア

(B) 株: DSM 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 1:

ATGGCCAGAT CGATGCCCTTC CAGGGGTGGTG GCAGGGGAG TGGCATGGCG	50
GATGAGCGTC GCGCCGTTTG CGGGGGCGAC CGCGGTGATG ACGCTTGGCA	100
CGACGCACGC GGCAGATEGGG CGAACCGCGC CGCCCGACGA CTACCGGACG	150
ACCGCTTATC CGACATCCT CGTGGACCGGG CTACCGGCTA CGGACAACTA	200
CGCGGGCTG CGTGGACTACT CGTACCGCAT CGAGGAAGAC CTGCGACCG	250
ATGGCGCGAC CGTCTACGTC CGGAACCTGTC CGGGCTTCCCA GAGCGACGAC	300
GGGCGGAACG GGGCGGGCGA ACAGTGTGTC CGGTACGTGA AGACGCTGCT	350
CGCGGGGACG GGGCGGACCA AGGTCAATCT CGTGGGCCAC NCCCAAGGGC	400
GGTCACCGTC CGCTTACGTT CGGCGTGTGCG CGCCCGATCT CGTGGCTCG	450
GTGACGACGA TCGGCACGCC GCACTGTGCA CGCAGTGTG CGCGACTTCG	500
CGAGGGCGTG CTGGCCTACCG ATCCGACCGG CGTCTCGTCA TCGGTGATCG	550
CGCGCTTCGT CAATGTGTTG CGAACATCCTGA CGAGCAGCAG CGACAAACAC	600
AACCAAGACG CACTCCGGTC GTGGAAGACG CTGAGCGACG CGAGGCGCC	650
CGCGTACAAC CGAAACTAATC CGAGCGCGGG CCTCGGTGCG CGGGGAGTT	700
GCCAGACCCG CAAACCGTGC GGTGCAACAC GCATCTGCTG	750
TATTCGTGGG CGGGCACGCC GATCCAGCCG AGCGCTCTCG TGTTGGTGT	800
CACGGCCCGG ACGGACACGA GCACCATTCG GCTCGTCAT CGGGCGAACG	850
CGCTCGACCC GTGACCGCTT CGCGCTGTTG CGACCGGACAC GGTGATGATC	900

特表平7-504561 (16)

AAACGGGGCT CGGGCCCCGAA CGACGGGCTC GTATCGAAGT GCAGCGCGCT 950
GTACGGGCAAG GTGCTGAGCA CGACGCTACAA CTGGAAACCAT ATCGACGAGA 1000
TCAACCGATT GCTCGGCCTG CGCGGGCGGA ATCGGAAAGA TCCCGCTCGG 1050
GTGATCCGCA CGCATGGCAA CGCGCTGAAAG CTGGCGGGCT TG 1092
(2) SEQ ID NO:2 についての情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 1032 塩基対
- (B) 種類: 核酸
- (C) 順の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖
- (II) 分子の型: DNA (ゲノム)
- (III) ハイポセティカル: NO
- (IV) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (VI) 起源:

- (A) 生物: シュードモナス セバシア
- (B) 株 : DSH 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 2:

ATGGCGGCAC GTGAAGGGCG CGGGCGCGCTG GCGCGGCCGCTG CTGCAGTCTA 50
CGGTGTCGTG GGGCTGGCGG CGATCGCGCG CGTCGGGATG TGAGCGGGGG 100
CGGGATGGCA TCGCGGTACG CGTAGGGTCTG CGCAAGCGCC CGATCGGGCG 150
GCAGCTGGCG CGGTGGCTGC CGCACCGCGG CAGGGCGGCCG TCGCGGCGAG 200
CGGGGGCGCTG CGGTGGCTGC TGGCGCGCTC CGAGCGGCCG CGCGTGCCTC 250
TCGATGGGG CGGGCATCTC CGGAAGGTGC CGCGCGGTCTG CGAATTCTTC 300
GACTACTGCC TGACCGGCGCA GAGCGACCTC AGTGGCGGCCG CGCTCGATGC 350
ACTCGTCGTG CGCCAGATTC CGCGCGAGCT CGACGGCAGC CGCGCGCAGG 400
CCGAGCGCT CGACGTGTGG CATCGCTATC GTGGCTATC CGACGGCGCTC 450

GGAAACTCC CGCATGCCGG CGCGGTCCAC AGTCCGACCG TGGCGCGCT 500
GCAGCTCGCG CTGGACCCAGC CGCGCATCGAT CGCGTATCGC ACCTCGCGCG 550
ACTGGAGCCA CGCGTCTTC CGCGGGGAGC AGTGGCGGCC CGCGCTACGAT 600
CTCGCGCGGC TGAGAGATCCG CGAGGATCGC ACCTCGACCG ATGCCAGAA 650
GGCGAACGG CTGCGGGCGC TCGACCAACA GATGCGGCCG GACGAACGGC 700
CGCGTCAAGCA CGCGGTCCAG CGCGAGCGGG CGCGCATCGA CGAGAGTCGG 750
NAGTTGAGA AGAGCGGGAC GACCCCGAT GCGATGCCGG CGCGACTGAC 800
CGACGACGCTC CGGGCGGAGG CGCGCGGCCG CGTCCGCCAG ATGCCAGGAG 850
ACGACCGATC CTGGCAGAGN CGCTACCGGE ACTATCGGC CGACGCGCGC 900
CAGATCGACT CGGGCGGCCGCTG CGCGCGCAGC CGCAGATCGC 950
CGGACTGCGG CGAGCGCTGT TCACGAAGGC CGCGGAAGCC GTGCCGCCGG 1000
CGTCACTCGA TCGCGGCCGG CGCAGCGCGC AG 1032

(2) SEQ ID NO:3 についての情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 364 アミノ酸
- (B) 種類: アミノ酸
- (C) 順の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖
- (II) 分子の型: タンパク質
- (III) ハイポセティカル: NO
- (IV) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (VI) 起源:

- (A) 生物: シュードモナス セバシア
- (B) 株 : DSH 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 3:

Met Ala Arg Ser Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala 1 5 10 15
Cys Ala Met Ser Val Ala Pro Phe Ala Gly Ala Thr Ala Val Met 20 25 30
Thr Leu Ala Thr Thr His Ala Ala Met Ala Ala Thr Ala Pro Ala 35 40 45
Asp Asp Tyr Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Ile Ile Leu Val His Gly 50 55 60
Leu Thr Gly Thr Asp Lys Tyr Ala Gly Val Leu Glu Tyr Trp Tyr 65 70 75
Gly Ile Glu Asp Leu Glu Glu His Gly Ala Thr Val Tyr Val 80 85 90
Ala Asn Leu Ser Gly Phe Glu Ser Asp Asp Gly Pro Asn Gly 95 100 105
Gly Glu Glu Leu Ala Tyr Val Lys Thr Val Leu Ala Ala Thr 110 115 120
Gly Ala Thr Lys Val Asn Leu Val Gly His Asn Glu Gly Leu 125 130 135
Thr Ser Asp Tyr Val Ala Ala Val Ala Pro Asp Leu Val Ala Ser 140 145 150
Val Thr Thr Ile Gly Thr Pro His Arg Asn Asn Glu Phe Ala Asp 155 160 165
Phe Val Glu Gly Val Leu Ala Tyr Asp Pro Thr Gly Leu Ser Ser 170 175 180
Ser Val Ile Ala Ala Phe Val Asn Val Phe Gly Ile Leu Thr Ser 185 190 195
Ser Ser His Asn Thr Asn Glu Asp Ala Leu Ala Ser Leu Lys Thr 200 205 210
Leu Thr Thr Ala Glu Ala Ala Tyr Asn Glu Asn Tyr Pro Ser 215 220 225
Ala Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ser Cys Glu Thr Gly Asn Pro Thr 230 235 240
Gly Thr Val Arg Asn Asn Thr His Leu Leu Tyr Ser Trp Ala Gly 245 250 255

Thr Ala Ile Glu Pro Thr Leu Ser Val Phe Gly Val Thr Gly Ala 260 265 270
Thr Asp Thr Ser Thr Ile Pro Leu Val Asp Pro Ala Asn Ala Leu 275 280 285
Asp Pro Ser Thr Leu Ala Leu Phe Gly Thr Gly Thr Val Met Ile 290 295 300
Asn Arg Gly Ser Gly Pro Asn Asp Asp Gly Leu Val Ser Lys Cys Ser 305 310 315
Ala Leu Tyr Gly Glu Val Leu Ser Thr Ser Tyr Lys Trp Asn His 320 325 330
Ile Asp Glu Ile Asn Glu Leu Leu Gly Val Arg Gly Ala Asn Ala 335 340 345
Glu Asp Pro Val Ala Val Ile Arg Thr His Ala Asn Arg Leu Lys 350 355 360

Leu Ala Gly Val

(2) SEQ ID NO:4 についての情報:

(1) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 344 アミノ酸
- (B) 種類: アミノ酸
- (C) 順の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖
- (II) 分子の型: タンパク質
- (III) ハイポセティカル: NO
- (IV) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (VI) 起源:

- (A) 生物: シュードモナス セバシア
- (B) 株 : DSH 3401

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Ala Arg Glu Gly Arg Ala Pro Leu Ala Arg Arg Ala Ala 1 5 10 15

特表平7-504561 (16)

Val Tyr Gly Val Val Gly Leu Ala Ala Ile Ala Gly Val Ala Met
 20 25 30
 Trp Ser Gly Ala Gly Trp His Arg Gly Thr Gly Ser Val Gly Glu
 35 40 45
 Ala Pro Asp Ala Ala Ala Val Gly Gly Val Ala Ala Ala Pro Pro
 50 55 60
 Glu Ala Ala Val Pro Ala Ser Ala Gly Leu Pro Ser Ser Leu Ala
 65 70 75
 Gly Ser Ser Ala Pro Arg Val Pro Leu Asp Ala Gly Gly His Leu
 80 85 90
 Ala Lys Val Arg Ala Val Arg Asp Phe Asp Tyr Cys Leu Thr
 95 100 105
 Ala Gln Ser Asp Leu Ser Ala Ala Leu Asp Ala Leu Val Val
 110 115 120
 Arg Glu Ile Ala Ala Gln Leu Asp Gly Thr Ala Ala Gln Ala Glu
 125 130 135
 Ala Leu Asp Val Trp His Arg Ala Tyr Leu Asp Ala Leu
 140 145 150
 Ala Lys Leu Arg Asp Ala Gly Ala Val Asp Lys Ser Asp Leu Gly
 155 160 165
 Ala Leu Gln Leu Ala Leu Asp Gln Arg Ala Ser Ile Ala Tyr Arg
 170 175 180
 Thr Leu Gly Asp Trp Ser Gln Pro Phe Phe Gly Ala Glu Gln Trp
 185 190 195
 Arg Gln Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Leu Lys Ile Ala Gln Asp Arg
 200 205 210
 Thr Leu Thr Asp Ala Gln Lys Ala Glu Arg Leu Ala Ala Leu Gln
 215 220 225
 Gln Gln Met Pro Ala Asp Gln Arg Ala Ala Gln Ala Val Asp
 230 235 240
 Arg Gln Arg Ala Ala Ile Asp Gln Ser Pro Xaa Leu Gln Lys Ser
 245 250 255
 Gly Thr Thr Pro Asp Ala Met Arg Ala Gln Leu Thr Gln Thr Leu
 260 265 270
 Gly Pro Glu Ala Ala Ala Arg Val Gly Glu Met Gln Gln Asp Asp
 275 280 285

Ala Ser Trp Gln Xaa Arg Tyr Ala Asp Tyr Ala Ala Gln Arg Ala
 280 285 300
 Glu Ile Glu Ser Ala Gly Leu Ser Pro Gln Gly Arg Asp Ala Glu
 305 310 315
 Ile Ala Ala Leu Arg Gln Arg Val Phe Thr Lys Pro Gly Glu Ala
 320 325 330
 Val Arg Ala Ala Ser Leu Asp Arg Gly Ala Gly Ser Ala Glu
 335 340

(2) SEQ ID NO:5 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：2118 基塩対

(B) 種類：核酸

(C) 種の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii) 分子の型：DNA (ゲノム)

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメントの型：内部

(vi) 配列の詳細：SEQ ID NO: 5:

ATGGCCGAGGA CGATGCCGTC CAGGGTGGTG GCAGGGGGAG TGGCATGGCG 50
 GATGAGGATC CGCCCGTTCG CGGGGGACGAC CGCGGTGATG AGCGCTCGCGA 100
 CGACGCCACCG CGCAATGGCG CGCACCGGCGC CGCGCGCTGG CTACCGCGCG 150
 ACCGGTTAAC CGATCATCTCT CGTCACGCGGG CTCTGGGTA CGGCACAGTA 200
 CGGCGGGCTG CTCGAGTATT GGTACGGCACT CGAGGAGGAC CTGCAACAGA 250
 ACGGTGGCAC CGTCTACGTC CGCAACCTGT CGGGTTTCCA CGGCCGACGAC 300
 GGGCGGAAACG CGGCCGGGCGA ACAATTGCTC GCTTACGTGA AGACGGTGTCT 350
 CGCGGGCGACG CGGGCGGACCA AGGTCAACT CGTCGGTCAC AGCCAGGGCG 400
 CGCGCTCGTC CGCTCTATGTT GCTGGCGTCG CGCCGCGATCT CGTTCGGCTCG 450
 CTGACCGACGA CGGGCGGCGAG CGACGCTCTGG CGCCGCGGCG 500

CGAGGACGCTG CTGGCGTAGG ATCCCACCGG CCTTTCGCTCA TCGGTGATCG 550
 CGGGCTTCTG CAAATGTTTCG GGGATCTCTGA CGAGCAGGAG CGAACACACC 600
 AACCAAGGAGC CGCTCGCCCG ACTGCAAGACG CTGACCCACCG CACGGGGCCCG 650
 CACCTACAAAC CAGAACTATC CGAGGGGGGG CCTGGGTGCG CGGGGGCAGTT 700
 CGCAGACCGG TCGGGCGACG GAAACCGTGG CGCGGAAACAC CGACCTGCTG 750
 TATTCGCTGGG CGGGCAAGGGC GATCCAGCGG ACCGCTCTCCC TGTTCGGCGT 800
 CACGGGGCGG ACCGACACGA CGACCCCTTCG GCTGGTGGAT CGGGCGAACG 850
 TGCTCGACCT GTGGACGCTC CGCGCTTCTG GCACCGGGACG GGTGATGATC 900
 AACCGGGCGCT CGGGCGAGAA CGACGGGCTC GTGTCGAAGT GCAGTGGCGCT 950
 CTACCGGCAAG CTGCTGAGCA CGAGCTACAA GTGAAACCCAC CTGCAACGAA 1000
 TCAACCAACT CGTCGGCGTC CGGGCGCGCT ATGGGGAAAGA TCCCGTCCGG 1050
 GTGATCCCGA CGCATGCGAA CGGGCTGAAAG CGGGGGGGGG CACGAGGGGG 1100
 ACGGGGCGCG CGGGGGCGCC CGGGCGTGGY CTATGCTGGC GTGGGGCGCTG 1150
 CGGGCGATTCG CGGGCGTGGC ATGTGGAGCG CGGGGGGGGG CGATGGGGGG 1200
 ACGGGGCGCAT CGGGCGAGCC CGGGGATGCG CGGGGGCGAC CGGGGACGGG 1250
 TGCGCGACCG CGGGAGGGCG CGGTGGCGGC AAGCAGGAGG CTGCGCGCGT 1300
 CGGTGGCGGG CTCAGGGCG CGGGCGTGGC CGGTGGATGC CGGGGGCGCAT 1350
 CTGGCGAGGG CGGGCGCGCGT CGGGGATTCG TTGGACACTG CGGTGGACGG 1400
 CGAGAGGAC CGTGAATGCGG CGGGGCTCGA TGCGTTCGTC ATGCGCGAGA 1450
 TTGGCGACCA GCTCGACGGG ACCGTTGGCGG CGGGCGAGGC GCTCGACGTC 1500
 TGGCACCGGT ATCGCGCGTA TCTCGACGCA CTGGCGAAAT TGCGCGATGC 1550
 CGGGGGGCTC GACAGAGTCG ACCTGGGCTCG ATTCGAGCTC CGGGCGACCC 1600
 ACGGGGCGCTC GATCGCGTAC CGGTGGCGTGC CGGACTGGAG CGACCCGCTC 1650
 TTGGGTGCGG AGCAATGGCG CGAGGCGCTAC GACCTCGGGC CGCTGAAGAT 1700
 CGGGCAGGAC CGGGCGCGTGA CGGAGATGGCGA GAAGGGCGAA CGGGCGCGG 1750
 CGCTCGAACCA CGAGATGGCG CGGGAGCGAAC CGGGCGCGCA CGAGCGCGTC 1800
 GACCGGGCGAC CGGGGGCGAT CGACCAAGATC AGAAGAGCGG 1850

GGGGACGGCCC GATGGCGATGC CGCCACAACT GACGCAGACG CTGGGGCCCC 1900
 AGCGGGCCGC CGCGCGTCGCG CAGATGCGAGP AGGACGACGCC ATGCGGGCG 1950
 AGGGCGCTACG CGGACTACGCG CGCGCAGCGT CGCGAGATCG AGTGGGGCCCG 2000
 CCTGTCGGCG CAGGATCGCG CGCGCAGAT CGGGCGCTG CGGCAGCGCG 2050
 TGTTCGCGAA CGCCGGCGAA CGCGCGCGCG CGCGCATCGCT CGATGGGGGG 2100
 CGGGCGAGGG CGGGCGTAA 2118

(2) SEQ ID NO:6 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：19 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

(C) 種の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii) 分子の型：ペプチド

(iii) ハイポセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(v) フラグメントの型：内部

(vi) 起源：

(A) 生物：ショードモナス セバシア

(B) 株：DSM 3959

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO: 6:

Thr Ala Arg Gly Arg Ala Pro Leu Arg Ala Val Val Tyr
 1 5 10 15

Gly Ala Val Gly

(2) SEQ ID NO:7 についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：19 アミノ酸

(B) 種類：アミノ酸

特許平7-504561 (17)

- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎮
- (E) 分子の型: ベブチド
- (F) ハイポセティカル: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (vi) 起源:
 - (A) 生物: シュードモナス セバシア
 - (B) 株: DSH 3959

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 7:

Ala Arg Thr Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala Ala
5 10 15
Met Ser Ile Ala

(2) SEQ ID NO: 8 についての情報:

- (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 17 アミノ酸
 - (B) 種類: アミノ酸
 - (C) 鎮の数: 一本鎮
 - (D) トポロジー: 直鎮
- (E) 分子の型: ベブチド
- (F) ハイポセティカル: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部
- (vi) 起源:
 - (A) 生物: シュードモナス セバシア
 - (B) 株: DSH 3959

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 8:

Ala Arg Thr Met Arg Ser Arg Val Val Ala Gly Ala Val Ala Met
5 10 15
Ile Ala

(2) SEQ ID NO: 9 についての情報:

- (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 56 塩基対
 - (B) 種類: 核酸
 - (C) 鎮の数: 一本鎮
 - (D) トポロジー: 直鎮
- (E) 分子の型: DNA (ゲノム)
- (F) ハイポセティカル: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: 内部

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 9:

CGCGTAAAGCT TCACATTGAA ACGGGAGGAC AATCATGGCC CCTGGCTACG 50
CGGGCA' 56

(2) SEQ ID NO: 10 についての情報:

- (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 56 塩基対
 - (B) 種類: 核酸
 - (C) 鎕の数: 一本鎮
 - (D) トポロジー: 直鎮
- (E) 分子の型: DNA (ゲノム)
- (F) ハイポセティカル: NO
- (G) アンチセンス: YBS
- (V) フラグメントの型: 内部

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 10:

CGCGTGGCG CGTAGCCAGC GGCCATGATT CTCCCTGGCT TTCAATGTGA 50
AGCTTA 56

(2) SEQ ID NO: 11 についての情報:

- (i) 配列の特徴:
 - (A) 長さ: 6 アミノ酸
 - (B) 種類: アミノ酸
 - (C) 鎕の数: 一本鎮
 - (D) トポロジー: 直鎮
- (E) 分子の型: ベブチド
- (F) ハイポセティカル: NO
- (G) アンチセンス: NO
- (V) フラグメントの型: N-末端
- (vi) 起源:
 - (A) 生物: シュードモナス セバシア
 - (B) 株: DSH 3959

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 11:

Ala Ala Gly Tyr Ala Ala
1 5

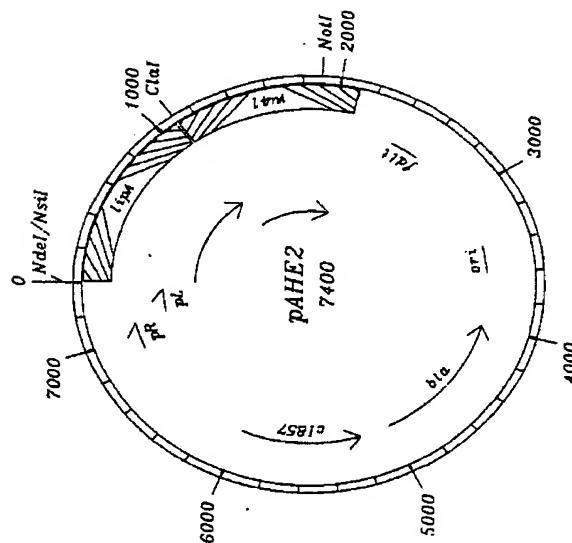


Fig. 1

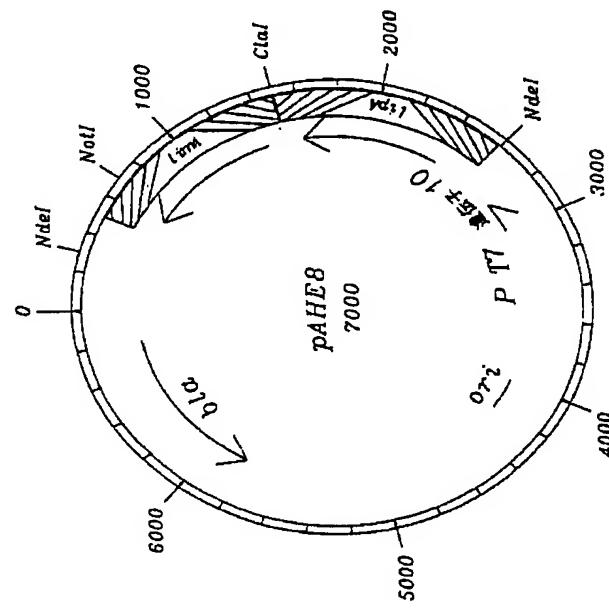


Fig. 2

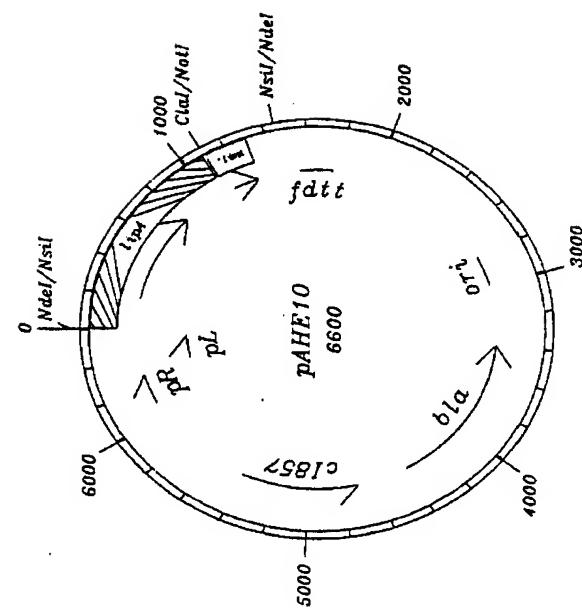


Fig. 3

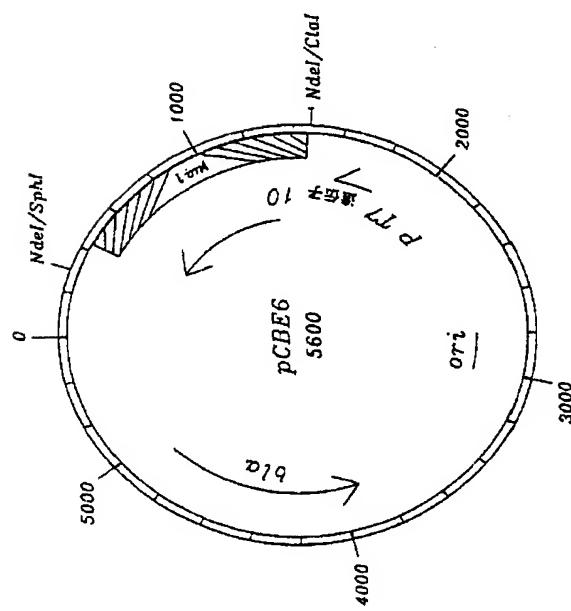


Fig. 4

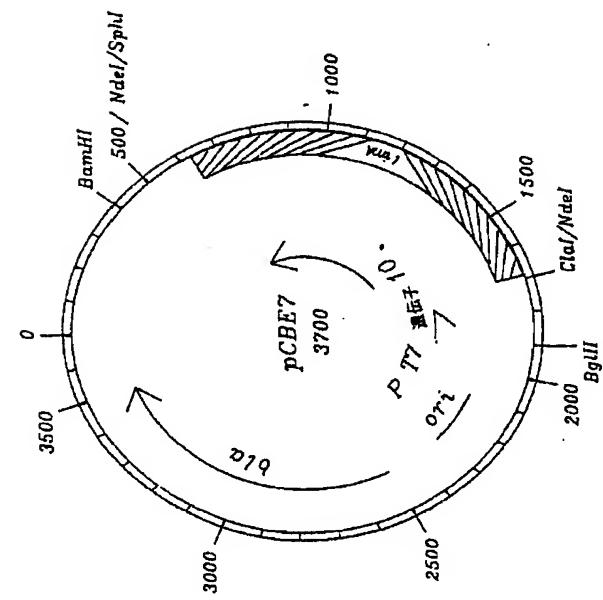


Fig. 5

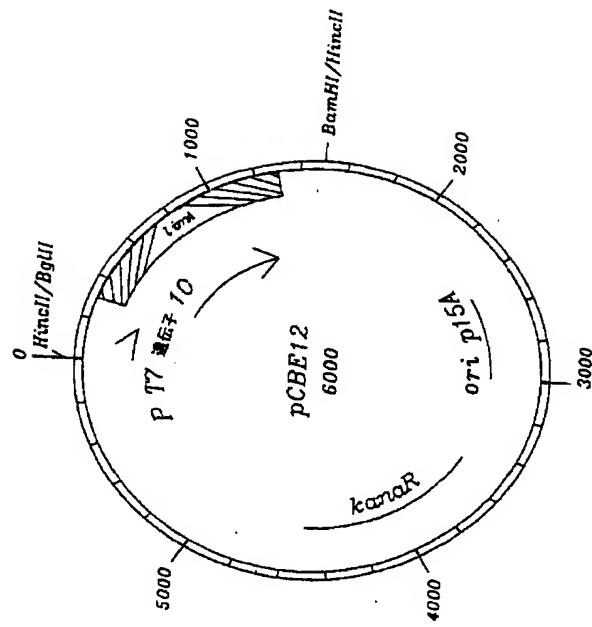


Fig. 6

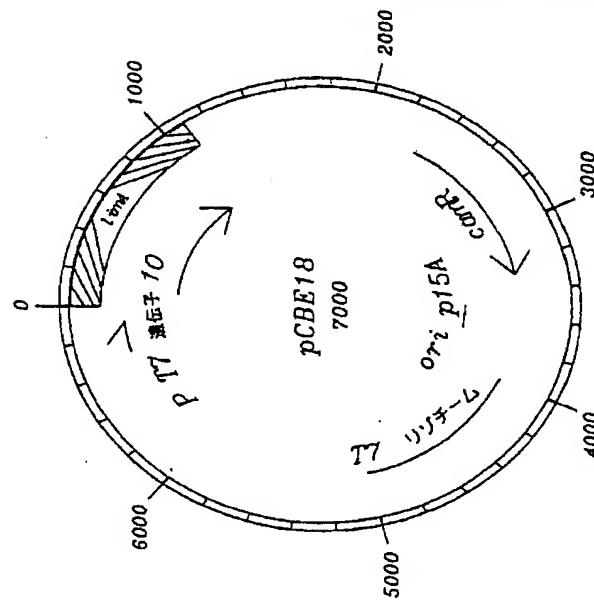


Fig. 7

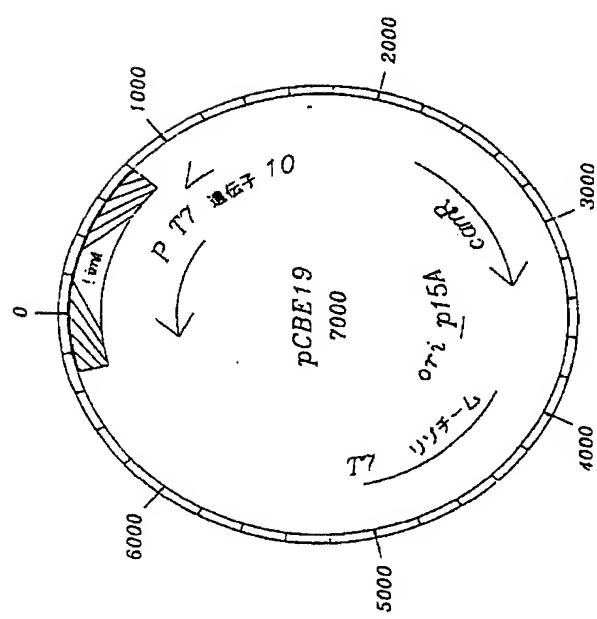


Fig. 8

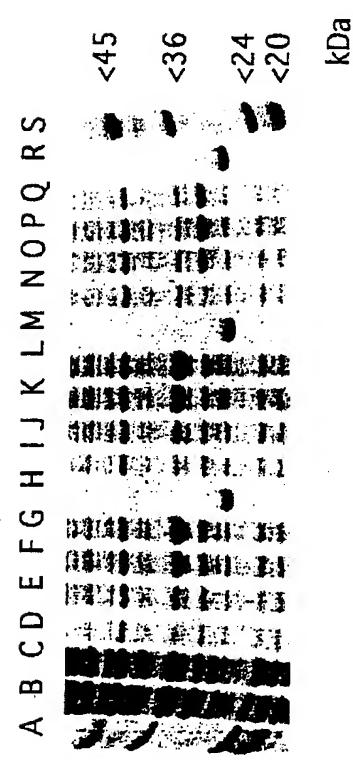


Fig. 9

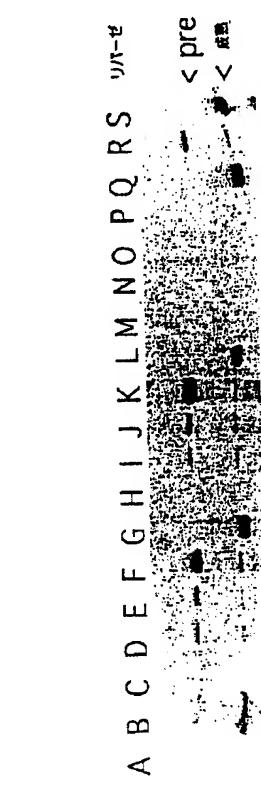


Fig. 10



Fig. 11

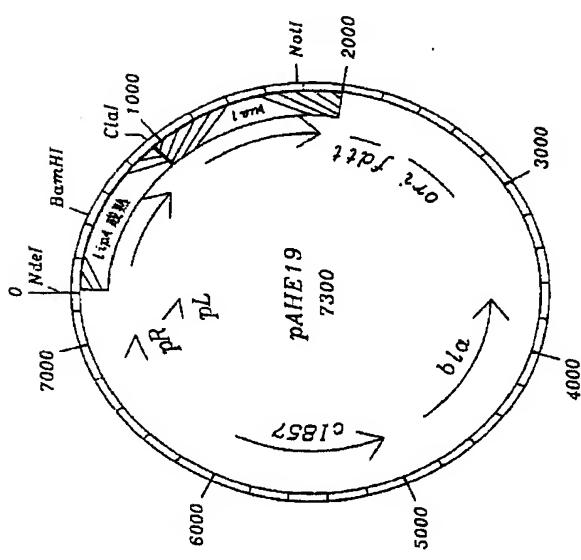


Fig. 12

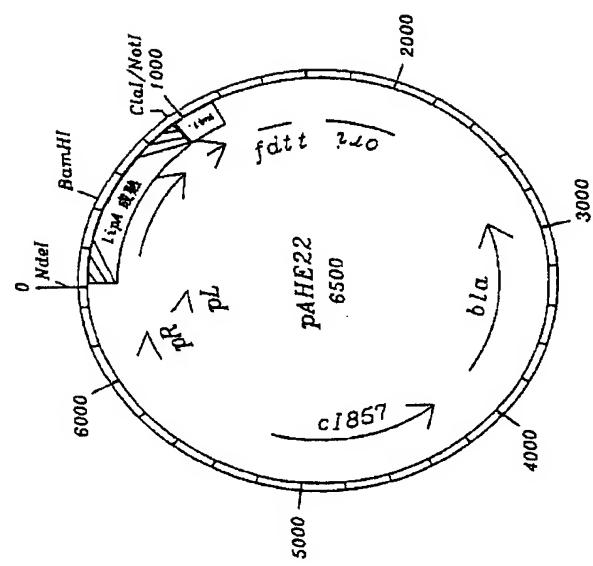


Fig. 13

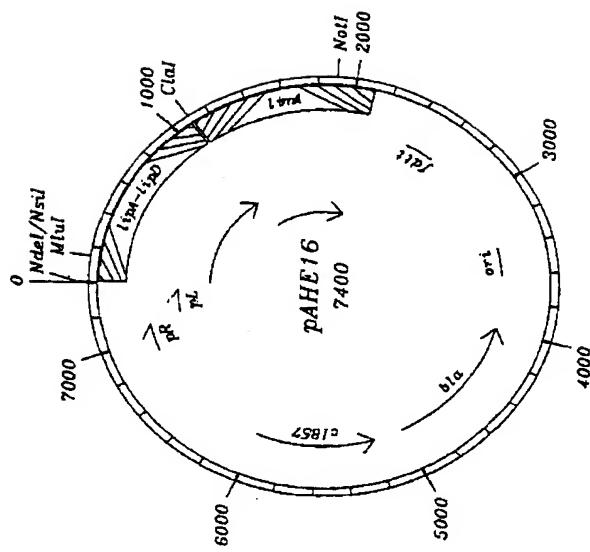


Fig. 14

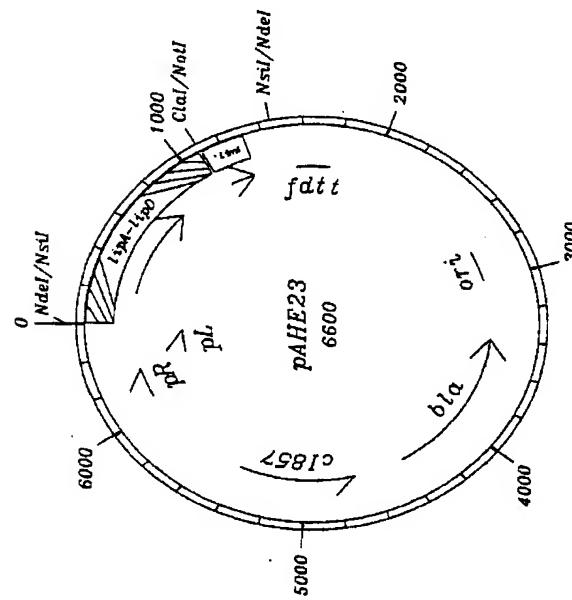


Fig. 15

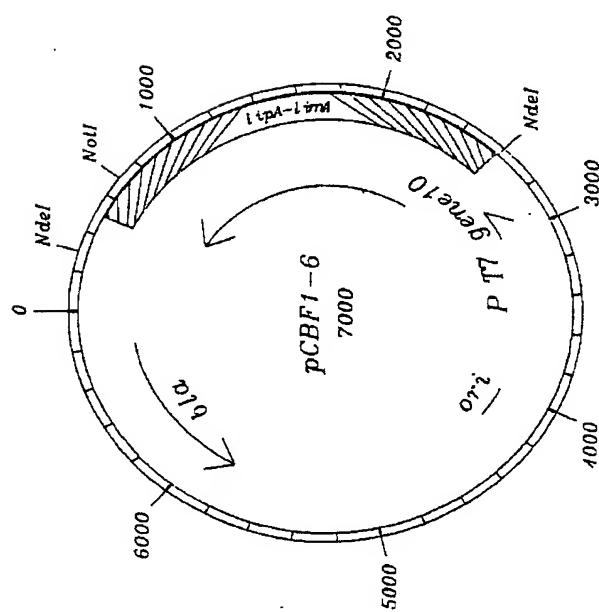


Fig. 16

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成6年6月20日

特許庁長官 麻生 浩司

- 特許出願の表示
PCT/DK92/00391
- 発明の名称
リバーゼの製造のための方法
- 特許出願人

住 所 デンマーク国、デーコー-2880 バグスバエルト、
ノボ アレ (番地なし)
名 称 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカフ

- 代理 人
住 所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所
電話 (3504)0721
氏 名 弁理士 (7751) 石 田 敏

- 補正書の提出年月日
1994年3月25日
- 添付書類の目録
補正書の翻訳文



1通

示する。

W091/00908号は、宿主細胞の中で発現されるポリペプチドによる異種宿主細胞におけるシードモナス セバシア リバーゼの生産を開示しており、そのポリペプチドはリバーゼ生産の調節因子として働いている。

発明の概要

驚くべきことに、組織宿主細胞により生産される活性リバーゼ酵素の収率は、その細胞から回収されたリバーゼを変性、それに続くシャペロン(chaperone)分子の存在下での再生に付したときに高めることが可能であることが見出された。

従って、本発明はインピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法に開示し、この方法は

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼが不活性又は部分的に活性な状態で生産されるに適する条件のもとで培養し、その培養物からこのリバーゼ酵素を回収し、次いでその回収されたリバーゼ酵素を変性に付する。

(b) この変性したリバーゼ酵素をシャペロン分子と混ぜ合わせる、そして

(c) 工程 (b) の混合物を再生に付して、活性リバーゼ酵素を生成すること、

を含んで成る。

他方、本発明はインピトロで活性リバーゼ酵素を製造するための方法に開示し、この方法は

(a) リバーゼ酵素をエンコードするDNA配列で形質転換された宿主細胞を、そのリバーゼ酵素が不活性又は部分的に活性な状態で

リボソーム結合部位が先行していよい。

本発明に従うと、シャペロン分子はシードモナス リバーゼ調節タンパク質、好ましくはシードモナス セバシア リバーゼ調節因子(W091/00908号に開示)、シードモナス グルメ リバーゼ調節因子及びシードモナス アエルギノーザ リバーゼ調節因子より成る群から選ばれるもの、又は任意のかかるリバーゼ調節因子の誘導体であることが好都合である。

本明細書において、リバーゼ調節因子の誘導体は、リバーゼ酵素の誘導体に関して上記したのと同じ状況である、即ち、前記の通りに、天然リバーゼ調節因子についてコードするDNA配列を適宜改変することにより天然リバーゼから誘導されたシャペロン活性を有するタンパク質であると理解される。この誘導体のシャペロン活性は、例えば本明細書に記載の通り、活性リバーゼ酵素の生産におけるその誘導体の能力の分析により決定されうる。

本発明にかかる方法の好適な履様において、リバーゼ酵素はシードモナス セバシア リバーゼ又はその誘導体であり、そしてシャペロン分子はシードモナス セバシア リバーゼ調節因子(又はその誘導体)でありうる(共に、W091/00908号に開示)。

リバーゼ酵素及び/又はシャペロン分子をエンコードするDNA配列を含んで成る本発明のDNA構築体はゲノム又はcDNA起源であってよく、例えば適当な生物のゲノム又はcDNAライブライマーを用意し、そしてリバーゼ又はシャペロンの全体又は一部をコードするDNA配列を、標準の技術に従う(Sambrookら、1989を参照のこと)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることによって得られるものである。

本発明のDNA構築体は確立されている標準的な方法、例えばS. L. Beaucageら(1981)、Matthesら(1984)により述べられているホ

スホアミジット法により合成的に製造することもできる。ホスホアミジット法に従うと、オリゴヌクレオチドを例えれば自動DNA合成装置で合成し、精製、リゲートそして適宜のベクターの中にクローニングする。

最後に、このDNA構築体は合成とゲノムとの複合物、合成とcDNAとの複合物、又はゲノムとcDNAとの複合物であって、合成、ゲノム又はcDNA起源のフラグメント(適宜)を、この全DNA構築体の様々な部分に対応するフラグメントに、標準の技術に従ってリゲートすることによって製造したものである。

本発明のDNA構築体において、リバーゼ構築体をエンコードするDNA配列はシードモナス又はクロモバクター種に由来するものであってよい。例えば、前記第一DNA配列は、シードモナス セバシア、シードモナス フラギ、シードモナス グラジオリ、シードモナス フルオレセンス、シードモナス スタッフェリ、シードモナス アルカリゲンス、シードモナス シュードアルカリゲンス、シードモナス プチダ、シードモナス グルメ、シードモナス アエルギノーザもしくはクロモバクター ピスコスム リバーゼ、又は上記のリバーゼ酵素の誘導体をエンコードするものでありうる。前記第二DNA配列は、シードモナス セバシア リバーゼ調節因子、シードモナス グルメ リバーゼ調節因子、シードモナス アエルギノーザ リバーゼ調節因子、もしくはその他のシードモナス リバーゼ調節因子タンパク質、又は任意のこれらの調節因子の誘導体をエンコードするものでありうる。最も好ましくは、この第一DNA配列はシードモナス セバシア リバーゼ又はその誘導体をエンコードし、そして第二DNA配列は引用することで本明細書に組入れるW091/00908号に記載のシードモナス セバシア リバーゼ調節因子又はそれらの誘導体をエンコード

するプラスマミドpCBB7(図5)は、同じ1.2 kbのClaI-SphIフラグメントを発現ベクターpIT7-7にサブクローニングすることによって構築した。E103はpCBB7で形質転換されたBL21(DE3)pLys Sである。E102及びE103の誘発により、約32KDの分子量のタンパク質が観察された。

プラスマミドpCBB12(図6)は、pCBB7のBglII-BamHIフラグメントをpACYC177にサブクローニングすることによって構築した。L10は、pS51B(W091/00908号のFig. 3に記載)から発現されたりバーゼに対してトランスにおいてpCBB12から発現し、そしてpANB10はリバーゼ活性をもたらしめた。

プラスマミドpCBB18及び19(図7及び8)は、pCBB7のBglII-BamHIフラグメントをpLys SのBamHI部位にサブクローニングすることによって構築した。L10はpANB10由来のリバーゼに対してトランスでpCBB18及び19から発現し、リバーゼ活性をもたらしめた。

例3

高レベルのタンパク質発現を獲得するための増殖/誘発実験

下記の通りに培養物を誘発せしめて高レベルのL1pA及びL1mAの両者を生成せしめた。大腸菌株E57(JA221/pARH2)及びE66(JA221/pARH10)を30°Cで250 rpmにて一夜増殖させた。その培養物を1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで30°C、250 rpmで増殖させた。次にその培養物を42°Cで増殖するようにした。大腸菌株E102(BL21(DE3)pLys S/pCBB6)は37°Cで一夜増殖させ、1:100に希釈し、そしてA600が0.5となるまで増殖させた。次いでIPTGをこの培養物に1.5 mMの最終濃度となるまで加えた。15分後、リファンビシンを最終濃度100 μg/mlとなるまで加えた。その培養物を37°Cでインキュベートし、且つその増殖中250 rpmで振った。各培養物を誘発の60、90及び120分目において取った。

特許平7-504561 (23)

再生実験中でのLipAによる、P.セバシア由来のブレリバーゼではなくリバーゼの活性化は、大腸菌の中で生産されたリバーゼタンパク質を利用しての結果と一致した。大腸菌リバーゼサンプルは約5%の成熟タンパク質及び95%のブレリバーゼより成る。変性前(pAHE2のみ)及び再生後(pAHE2及びpAHE19)に観察されたリバーゼ活性の値は、SDS-PAGEで認められたりバーゼタンパク質の純度より予測される値のほぼ5%に相当した。

例8

成熟LipAタンパク質の発現のための構造

シグナルペプチドを欠く形態、即ち成熟リバーゼとしてリバーゼLipAが発現されるプラスミドを構築した。これらは成熟リバーゼをエンコードするlipA遺伝子の改変バージョン、それに統一lipA遺伝子を含むpAHE19(図12)、及びlipA抜きの成熟リバーゼをエンコードするpAHE22(図13)である。それらは下記の通りに構築した：

下記のDNAフラグメントを合成した(標準方法)：

```

<HiuI> <BindIII>
5' - CGCGTAAGCTTACATTGAAAGGGGAGGAGAAATCATGCC-
3' - ATTCGAACTGTAACCTTCCTCTCTCTTCTTACCCG-
<HiuI>
GCTGGCTACGGGGCA - 3' (SEQ ID NO 9)
CGACCGATGCCGGCTGGCC - 5' (SEQ ID NO 10)

```

このDNAフラグメントは基本的には、バチルス リシュニホルニス axylリボソーム結合部位及び開始コドンを、成熟LipAタンパク質のN末端由来のアミノ酸ANGVYAA (SEQ ID NO 11) をエンコードする配列の前に含む。

このDNAフラグメントを、HiuI消化pSJ420 (W091/00908に記載のpSJ416と同一) にリゲートし、そしてpSJ438をプラスミドとして単

pAHE19: 成熟LipA, LipA,
pAHE22: 成熟LipA.

	変性前のLU	変性後のLU
pAHE19(100 μl)	0.5	0.5
pAHE19(100 μl) + LipA (10 μl)	0.5	0.5
pAHE19(100 μl) + LipA (20 μl)	0.5	0.75
pAHE19(100 μl) + LipA (30 μl)	0.5	0.75
pAHE19(100 μl) + 無-LipA リゼート (30 μl)	0.5	0.25
pAHE22(100 μl)	0.0	0.0
pAHE22(100 μl) + LipA (10 μl)	0.0	0.5
pAHE22(100 μl) + LipA (20 μl)	0.0	0.75
pAHE22(100 μl) + LipA (30 μl)	0.0	0.75
pAHE22(100 μl) + 無-LipA リゼート (30 μl)	0.0	0.0

例10

P.セバシア DSM 3401からのlipD及びlipAのクローニング及び配列株75-10A とも呼んでいるP.セバシア、DSM 3401の別の单離体は、DSM 3959由来のlipAに類似なリバーゼを生成する。

DSM 3401由来のリバーゼエンコードDNAのクローニング及び配列決定 (W091/00908に記載の標準方法を採用) は、lipD及びlipAに対して比較的高い相容性を有する以降lipD及びlipAと呼ぶ二つの遺伝子を示した。

極端なるDNAのGC含有に基づき、その配列は決定することが困難であり、従っていまだに部分的に未決定な配列が残っている—lipD遺伝子における4位、及びlipA遺伝子における2箇所の位置。

lipD開始コドンは、lipA及びlipAの場合のように、lipD停止コド

国際調査報告		International application No. PCT/OK 92/00391
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC5: C12N 9/20, C12N 15/67, C12N 15/55, C12N 15/62 According to International Patent Classification (IPC) or in each national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
International classification searched (classification system followed by classification numbers)		
IPC6: C12N		
Classification reported other than minimum requirements in the extent that such documents are relevant to the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above		
Document class not mentioned during the international search (name of class not used, unless preferable, search term(s) used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to date No.
P, X	EP, A1, 0464922 (UNILEVER NV ET AL.), 8 January 1992 (08.01.92), see page 3 lines 14-21, page 4 lines 15-26	5-14, 18-30
X	Journal of Bacteriology, Volume 173, No. 2, January 1991, Sten Jorgenson et al., "Cloning, Sequence, and Expression of a Lipase Gene from Pseudomonas aeruginosa: Lipase Production in Homologous Hosts Requires Two Pseudomonas Genes", see discussion page 669-686	5-14, 18-30
X	WO, A1, 100908 (NOVO NORDBIK A/S), 26 January 1991 (24.01.91), see page 3 lines 16-31 and the claims	5-14, 18-30
A	—	1-4, 15-17
X Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See pages for my answer.		
* General references of cited documents		
** A reference which is not cited but is referred to in another cited reference		
*** A reference which is not cited but is referred to in another cited reference		
**** A reference which is not cited but is referred to in another cited reference		
***** A reference which is not cited but is referred to in another cited reference		
Date of the regular examination of the international search		Date of filing of the international search report 05-04-1993
Name and mailing address of the ISA		Authorized officer
Swedish Patent Office Box 5059, S-101 42 STOCKHOLM Telephone No. +46 8 586 02 36		Yvonne Sjöström Telephone No. +46 8 793 25 00

国際調査報告		International application No. PCT/OK 92/00391
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category* Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to date No.
A	EP, A2, 0331376 (AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 6 Sept. 1989 (06.09.89)	1-30
A	Chemical Abstracts, Volume 111, No. 23, 20 November 1989 (20.11.89), (Columbus, Ohio, USA), Ellis R. John et al., "Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures", page 284, THE ABSTRACT No 1895477, Trends Biochem. Sci. (Pers. Ed.) 1989, 14 (8), 339-342, (a)	1-30

国際特許申告				International application No. 26/02/93 PCT/OK 92/00391
First document used as priority document	Publication date	Priority country (number)	Publication date	
EP-A1- 0464922	06/01/92	CA-A- 2044249	07/01/92	
WO-A1- 100908	24/01/91	ACME		
EP-A2- 0131376	06/09/93	JP-A- 3087187	11/04/91	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.*

C 12 P 19/38

//(C 12 N 15/09

C 12 R 1:07)

(C 12 N 1/21

C 12 R 1:19)

(C 12 N 9/20

C 12 R 1:38)

識別記号

- 庁内整理番号

F I

7432-4B

Z N A

C 12 R 1:07)

(72) 発明者 バックレイ, キャサリン エム.
 アイルランド国, コーク 4, ポーラドフ
 ロード, ランズケーブ パーク “タ
 ラ” (番地なし)

(72) 発明者 ホブソン, オードリー
 アイルランド国, ウィックロウ, アボカ,
 キルマジグハウス (番地なし)
 (72) 発明者 マッコンネル, デビッド ジェイ.
 アイルランド国, ダブリン, ブラックロッ
 ク, グローブ ロウン 31